

Aus dem Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und
Medizinische Mikrobiologie
Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. med. Sebastian Suerbaum

Funktionelle Charakterisierung der Cag-Typ-IV-
Sekretionssystem-Bestandteile CagH und CagL von
Helicobacter pylori

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Zahnmedizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Alexandra Emilia Maria Mayr
aus Frankfurt am Main

2020

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: PD Dr. Wolfgang Fischer

Mitberichterstatter: PD Dr. Dietmar Spengler
PD Dr. Michael Haas

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 07.05.2020

*Meiner Mutter Christa,
meinem Vater Ernst,
meiner Schwester Stephanie.*

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|-------|--|------|
| I. | Abkürzungsverzeichnis | VIII |
| II. | Abbildungsverzeichnis | XI |
| III. | Zusammenfassung | XIII |
| IV. | Eidesstattliche Versicherung | XV |
| 1 | Einleitung | 1 |
| 1.1 | <i>Helicobacter pylori</i> | 1 |
| 1.2 | Virulenzfaktoren von <i>Helicobacter pylori</i> | 4 |
| 1.2.1 | Vakuolisierendes Cytotoxin A | 4 |
| 1.2.2 | Adhäsine | 5 |
| 1.2.3 | Die <i>cag</i> -Pathogenitätsinsel kodiert ein Typ IV-Sekretionssystem | 5 |
| 1.3 | Zielsetzung..... | 9 |
| 2 | Material..... | 11 |
| 2.1 | Bakterienstämme | 11 |
| 2.1.1 | Verwendete <i>E. coli</i> -Stämme | 11 |
| 2.1.2 | Verwendete <i>H. pylori</i> -Stämme | 11 |
| 2.2 | Nährmedien für Bakterien..... | 13 |
| 2.3 | Antibiotika | 14 |
| 2.4 | Verwendete Zelllinien..... | 14 |
| 2.5 | Zellkulturmedien und -puffer..... | 14 |
| 2.6 | Plasmide | 14 |
| 2.7 | Oligonukleotide | 16 |
| 2.8 | Proteine und Enzyme | 18 |
| 2.9 | Antikörper..... | 18 |
| 2.10 | Verwendete Molekulargewichtsmarker | 20 |
| 2.11 | Lösungen und Puffer..... | 21 |

| | | |
|-------|--|----|
| 2.12 | Chemikalien | 24 |
| 2.13 | Kommerzielle Kits | 25 |
| 2.14 | Verbrauchsmaterialien | 25 |
| 2.15 | Geräte und Apparaturen | 26 |
| 3 | Methoden | 29 |
| 3.1 | Mikrobiologische Methoden | 29 |
| 3.1.1 | Kultivierung von <i>E. coli</i> | 29 |
| 3.1.2 | Kultivierung von <i>H. pylori</i> | 29 |
| 3.1.3 | Stammhaltung von Bakterien | 29 |
| 3.1.4 | Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen | 30 |
| 3.1.5 | Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen | 30 |
| 3.1.6 | Transformation von <i>H. pylori</i> | 30 |
| 3.1.7 | Bestimmung der optischen Dichte von Bakterien | 31 |
| 3.2 | Zellkultur | 31 |
| 3.2.1 | Kultivierung von AGS-Zellen | 31 |
| 3.2.2 | Stammhaltung von AGS-Zellen | 31 |
| 3.2.3 | In vitro Infektion von AGS-Zellen | 32 |
| 3.3 | Molekularbiologische Methoden | 32 |
| 3.3.1 | Isolierung genomischer DNA von <i>H. pylori</i> | 32 |
| 3.3.2 | Plasmid-Isolation von <i>E. coli</i> | 33 |
| 3.3.3 | Polymerase Kettenreaktion | 33 |
| 3.3.4 | Agarosegel-Elektrophorese | 34 |
| 3.3.5 | Aufreinigen von DNA-Fragmenten | 35 |
| 3.3.6 | Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen | 35 |
| 3.3.7 | Ligation | 36 |
| 3.3.8 | DNA Sequenzierung und Sequenzanalyse | 36 |

| | | |
|--------|---|----|
| 3.4 | Proteinbiochemie/Proteomics | 37 |
| 3.4.1 | Herstellung bakterieller Zelllysate | 37 |
| 3.4.2 | Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) .. | 37 |
| 3.4.3 | Coomassie Brilliant Blue-Färbung | 38 |
| 3.4.4 | Immunoblot (<i>Western Blot</i>) | 38 |
| 3.4.5 | Labeling von Q- <i>Tag</i> -Proteinen mit FITC-Cadaverin | 40 |
| 3.4.6 | Proteinfällung | 41 |
| 3.4.7 | Phosphotyrosin-Assay | 41 |
| 3.4.8 | ELISA | 42 |
| 3.4.9 | TEM-1-CagA-Translokations- <i>Assay</i> | 43 |
| 3.4.10 | Zellfraktionierung durch Ultrazentrifugation | 45 |
| 3.5 | Immunologie | 46 |
| 3.5.1 | Immunpräzipitation | 46 |
| 3.5.2 | <i>tandem-affinity-purification</i> | 46 |
| 3.5.3 | Immunfluoreszenz | 47 |
| 3.6 | Bildgebung mit dem Konfokal- und Fluoreszenzmikroskop | 48 |
| 3.7 | Statistische Auswertung | 48 |
| 4 | Ergebnisse | 49 |
| 4.1 | Visualisierung von CagH und CagL | 49 |
| 4.1.1 | Generierung von <i>H. pylori</i> -Mutanten mit einem mit CagH fusionierten Q- <i>Tag</i> | 50 |
| 4.1.2 | Generierung von <i>H. pylori</i> -Mutanten mit einem mit CagL fusionierten Q- <i>Tag</i> | 52 |
| 4.1.3 | Visualisierung des mit CagH bzw. CagL fusionierten Q- <i>Tags</i> | 54 |
| 4.1.4 | Generierung von <i>H. pylori</i> -Doppelmutanten mit einem mit CagH fusionierten M45- bzw. HA- <i>Tag</i> und einem mit CagL fusionierten myc- <i>Tag</i> | 56 |

| | | |
|-------|---|-----|
| 4.1.5 | Visualisierung von Epitop-getaggttem CagH und Epitop-getaggttem CagL mittels Immunfluoreszenz | 60 |
| 4.2 | Interaktionen von CagH, CagI und CagL | 62 |
| 4.2.1 | Identifizierung interagierender Proteine durch Immunpräzipitation | 62 |
| 4.2.2 | Identifizierung interagierender Proteine durch <i>tandem-affinity-purification</i> | 63 |
| 4.2.3 | Ort der Interaktion | 66 |
| 4.3 | Nachweis funktioneller Domänen von CagH | 68 |
| 4.3.1 | Generierung von <i>H. pylori</i> -Mutanten mit einem mit CagH fusionierten myc-Tag | 68 |
| 4.3.2 | Einfluss der Transmembran-Domäne und des N-terminalen Motivs auf die CagH-Produktion | 69 |
| 4.3.3 | CagA-Translokationseffizienz von myc-CagH-Mutanten..... | 70 |
| 4.3.4 | Einfluss des N-terminalen Motivs und der Transmembran-Domäne von CagH auf die Interaktion mit CagL..... | 72 |
| 4.3.5 | Einfluss des N-terminalen Motivs und der Transmembran-Domäne von CagH auf dessen Verteilung in der Bakterienzelle | 73 |
| 5 | Diskussion | 76 |
| 5.1 | Die Rollen von CagH, CagI und CagL im Typ IV-Sekretionsapparat | 76 |
| 5.2 | Eignung verschiedener Tags zur Untersuchung von CagH, CagI und CagL .. | 78 |
| 5.3 | Etablierung eines Protokolls zur Visualisierung von CagH und CagL auf der Oberfläche von <i>H. pylori</i> | 80 |
| 5.4 | CagH, CagI und CagL bilden Komplexe in <i>H. pylori</i> | 82 |
| 5.5 | Nachweis funktioneller Domänen von CagH | 84 |
| 6 | Fazit und Ausblick..... | 88 |
| 7 | Literaturverzeichnis | 90 |
| 8 | Danksagung | 100 |

I. Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------------------|--|
| * | Kennzeichnet die Zugabe von Protease-Inhibitoren <i>oder</i> bei mathematischen Formeln „mal“ (= Multiplikation) |
| Abl-Kinase | <i>Abelson tyrosine kinase</i> |
| Amp ^R | Ampicillin-Resistenz |
| AP | alkalische Phosphatase |
| BB | <i>brucella broth</i> |
| BCIP | 5-Brom-3-chlor-indolylphosphat-p-Toluidinsalz |
| bp | <i>basepair</i> |
| BSA | Bovines Serumalbumin |
| <i>cag</i> | <i>cytotoxin-associated gene</i> |
| CagA | Cytotoxin-assoziiertes Antigen A |
| <i>cag</i> -PAI | <i>cag</i> -Pathogenitätsinsel |
| Cam ^R | Chloramphenicol-Resistenz |
| CEACAM | <i>carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule</i> |
| CFP | <i>cyan fluorescent protein</i> |
| C-Terminus | Carboxy-Terminus-Ende eines Proteins |
| DAPI | 4',6-Diamidin-2-phenylindol |
| ddH ₂ O | doppelt destilliertes Wasser |
| DMF | N,N-Dimethylformamid |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| dNTP | Desoxyribonukleintriphosphate |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| EGFR | <i>epidermal growth factor receptor</i> |
| EGTA | Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure |

| | |
|---------------------|---|
| Erm ^R | Erythromycin-Resistenz |
| FCS | <i>fetal calf serum</i> |
| FITC | Fluorescein-5-isothiocyanate |
| FRET | <i>fluorescence resonance energy transfer</i> |
| g | mittlere Erdbeschleunigung |
| GEBS | Glycerin-EDTA-Bromphenolblau-Sarkosyl |
| GFP | <i>green fluorescent protein</i> |
| gp-Transglutaminase | <i>guinea pig</i> -Transglutaminase |
| GST | Glutathion-S-Transferase |
| HA | Hämagglutinin |
| HEPES | 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure |
| HopQ | <i>Helicobacter outer membrane protein Q</i> |
| IgG | Immunglobulin G |
| IL | Interleukin |
| IP | Immunpräzipitation |
| Kan ^R | Kanamycin-Resistenz |
| kb | Kilobase |
| kD | Kilodalton |
| LB | <i>lysogeny broth</i> |
| MBP | <i>maltose-binding protein</i> |
| NBT | Nitroblau-Tetrazoliumchlorid |
| NF-κB | <i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells</i> |
| N-Terminus | Amino-Terminus-Ende eines Proteins |
| PBS | <i>phosphate buffered saline</i> |
| PFA | Paraformaldehyd |
| PMSF | Phenylmethylsulfonylfluorid |
| POX | Meerrettichperoxidase |
| RIPA | <i>radioimmunoprecipitation assay</i> |
| RNaseE | Ribonuklease E |

| | |
|-------------------|---|
| rpm | <i>rounds per minute</i> |
| RT | Raumtemperatur |
| SDS | Natrium-Dodecyl-Sulfat |
| SE | Startextrakt |
| Sec | Transportproteine, abgeleitet von „Sekretion“ |
| SHP-2 Phosphatase | <i>Src Homology 2 Domain-containing Phosphatase 2</i> |
| Src-Kinase | <i>proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src</i> |
| STET | Saline-Tris-EDTA-Triton X-100 |
| T4SS | Typ IV-Sekretionssystem |
| TAE | Tris-Acetat-EDTA |
| TBS | <i>Tris-buffered saline</i> |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetramethyldiamid |
| TLR | <i>Toll-like receptor</i> |
| TM-Domäne | Transmembran-Domäne |
| TNF | Tumornekrosefaktor |
| Tyr | Tyrosin |
| v/v | Volumen-zu-Volumen-Verhältnis |
| VacA | Vakuolisierendes Cytotoxin A |
| w/v | Gewicht-zu-Volumen-Verhältnis |
| WB | Western Blot |
| WT | Wildtyp |
| α | anti |
| Δ | Deletion |

II. Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abbildung 3.4.1: Labeling von Proteinen mit fusioniertem Q-Tag | 40 |
| Abbildung 4.1.1: Generierung von <i>H. pylori</i> -Mutanten mit einem mit CagH fusionierten Q-Tag..... | 51 |
| Abbildung 4.1.2: Funktionelle Analyse der <i>H. pylori</i> -Mutanten mit einem mit CagH fusionierten Q-Tag..... | 51 |
| Abbildung 4.1.3: Generierung von <i>H. pylori</i> -Mutanten mit einem mit CagL fusionierten Q-Tag..... | 53 |
| Abbildung 4.1.4: Funktionelle Analyse der <i>H. pylori</i> -Mutanten mit einem mit CagL fusionierten Q-Tag..... | 53 |
| Abbildung 4.1.5: Visualisierung der <i>H. pylori</i> -Mutanten mit einem mit CagH bzw. CagL fusionierten Q-Tag..... | 55 |
| Abbildung 4.1.6: Generierung von <i>H. pylori</i> -Mutanten mit einem mit CagH fusionierten Epitop-Tag..... | 58 |
| Abbildung 4.1.7: Generierung von <i>H. pylori</i> -Mutanten mit einem mit CagL fusionierten Epitop-Tag..... | 58 |
| Abbildung 4.1.8: Funktionelle Analyse der [M45/HA-CagH] [myc-CagL]-Doppelmutanten..... | 59 |
| Abbildung 4.1.9: Visualisierung der [M45/HA-CagH] [myc-CagL]-Doppelmutanten. | 61 |
| Abbildung 4.2.1: Identifizierung interagierender Proteine durch Immunpräzipitation.. | 63 |
| Abbildung 4.2.2: Identifizierung interagierender Proteine durch <i>tandem-affinity-purification</i> | 65 |
| Abbildung 4.2.3: Lokalisation der Interaktion von CagH, CagI und CagL in der Bakterienzelle | 67 |
| Abbildung 4.3.1: Generierung von <i>H. pylori</i> -Mutanten mit einem mit CagH fusionierten myc-Tag..... | 69 |
| Abbildung 4.3.2: CagH-Produktion nach Transformation von myc-cagH-Konstrukten in <i>H. pylori</i> | 70 |
| Abbildung 4.3.3: CagA-Translokation (%) nach Transformation von myc-cagH-Konstrukten in einen Δ cagH- <i>H. pylori</i> -Stamm..... | 71 |

| | |
|--|----|
| Abbildung 4.3.4: CagA-Translokation (%) nach Transformation von myc- <i>cagH</i> -Konstrukten in einen Wildtyp <i>H. pylori</i> -Stamm | 72 |
| Abbildung 4.3.5: Identifizierung interagierender Proteine durch Immunpräzipitation.. | 73 |
| Abbildung 4.3.6: Einfluss der Verkürzung von CagH auf dessen Verteilung in der Bakterienzelle | 75 |

III. Zusammenfassung

Helicobacter pylori ist ein mikroaerophiles, gram-negatives Bakterium, das den menschlichen Magen besiedelt und einen bedeutenden Risikofaktor für die Entwicklung eines Magenkarzinoms darstellt. Maßgeblich für die Schwere des Verlaufs einer *H. pylori*-Infektion ist unter anderem das Vorhandensein der *cag*-Pathogenitätsinsel im Genom des infizierenden *H. pylori*-Stammes. Diese befähigt das Bakterium zur Produktion des Onkoproteins CagA und eines Typ IV-Sekretionssystems (T4SS), durch dessen Pilus das CagA-Protein in die Wirtszelle transloziert wird. Untersuchungsgegenstand der vorliegenden Arbeit sind die Lokalisation der Proteine CagH und CagL sowie deren Interaktion mit CagI. Diese drei Proteine werden in einem gemeinsamen Operon auf der *cag*-Pathogenitätsinsel kodiert und sind für die Translokation des Effektorproteins CagA essentiell. Neue Forschungsergebnisse deuten darauf hin, dass CagL und CagI als Bauelemente direkt am Aufbau des Pilus beteiligt sind. CagH hingegen scheint eine Kontrollfunktion beim Zusammenbau einzunehmen. Bei der dieser Arbeit zugrunde liegenden experimentellen Forschung konnte nach Generierung von Doppelmutanten mit fusionierten Epitop-*Tags* an CagH und CagL mittels Immunfluoreszenz ein Protokoll zur Visualisierung beider Proteine auf der Bakterienoberfläche etabliert werden, wodurch Informationen über deren Lokalisation gewonnen werden konnten. Dabei stellte sich ein interessantes Verteilungsmuster von CagL dar, welches Hinweise auf ein in der bakteriellen Zellwand befindliches Gerüst geben könnte, das als Leitstruktur für die geordnete Expression des T4SS in *H. pylori* dient. Beide Proteine werden zumindest teilweise auf der Bakterienoberfläche exponiert. Durch eine der *tandem-affinity-purification* ähnelnde Methode konnte gezeigt werden, dass CagH, CagI und CagL miteinander interagieren. Ein Nachweis dieser Interaktion schien jedoch abhängig von der Lokalisation in der Bakterienzelle zu sein. Komplexe der drei Proteine konnten ausschließlich in der löslichen Fraktion der Bakterienzelle nachgewiesen werden. Schlussendlich wurde untersucht, welchen Einfluss eine N-terminale Verkürzung von CagH auf dessen Lokalisation in *H. pylori*, seine Interaktion mit CagL, sowie auf die Fähigkeit der Bakterienzelle, das Effektorprotein CagA in die Wirtszelle zu translozieren, hat. Dabei zeigte sich, dass eine Deletion von 26 Aminosäuren in einer Aufhebung der CagA-Translokation

resultierte und das verkürzte Protein nicht mehr auf der Bakterienoberfläche exponiert wurde. Die Fähigkeit der Komplexbildung mit CagL blieb jedoch bestehen und erlosch erst bei Deletion von 52 Aminosäuren. Bei Betrachtung der erarbeiteten Ergebnisse, geben die hier vorgestellten Daten einen Einblick in die komplexen Rollen, welche die beiden Proteine CagH und CagL in der Bakterienzelle und bei der Genese des Typ IV-Sekretionsapparates spielen. Eine zukünftige Klärung der genauen Funktion sowie der Interaktionspartner der *cag*-Proteine birgt therapeutisches Potential zur Inhibition des Zusammenbaus des Sekretionsapparates und damit der mit einer *H. pylori*-Infektion assoziierten Erkrankungen.

IV. Eidesstattliche Versicherung

Ich, Alexandra Emilia Maria Mayr, erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Funktionelle Charakterisierung der Cag-Typ-IV-Sekretionssystem-Bestandteile

CagH und CagL von *Helicobacter pylori*

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Bonn, 08. Mai 2020

Ort, Datum

Alexandra Mayr

Unterschrift

1 Einleitung

1.1 *Helicobacter pylori*

Helicobacter pylori ist ein mikroaerophiles, spiralförmiges, polar begeißeltes und sich hervorragend an seine Umgebung anpassendes gram-negatives Bakterium, das die oberflächliche Epithel- und Schleimschicht (Mukosa) des menschlichen Magens besiedelt (Amieva & Peek, 2016). Das Bakterium wurde in den frühen 1980er Jahren von den Pathologen bzw. Gastroenterologen Barry Marshall und Robin Warren entdeckt, wofür beide später den Nobelpreis erhielten (Marshall & Warren, 1984; Warren & Marshall, 1983). Es steht mittlerweile fest, dass die Assoziation des Pathogens mit seinem menschlichen Wirt bereits über 50.000 Jahre zurückreicht (Atherton & Blaser, 2009). Der genaue Übertragungsprozess ist noch nicht hinreichend geklärt, jedoch scheinen der fäkal-orale und oral-orale Übertragungsweg zwischen Menschen am wahrscheinlichsten zu sein. Es gibt jedoch auch dokumentierte Fälle bei welchen eine Übertragung durch infizierte Nutztiere und kontaminierte Wasserreservoirs vermutet wird (Breckan et al., 2016).

Marshall und Warren beschrieben erstmals das Vorhandensein des Bakteriums in gastroscopisch gewonnenen Probenbiopsien von Patienten, die mit chronischer Gastritis oder gastroduodenalem Ulkus diagnostiziert waren. Üblicherweise beginnt die Kolonisation bereits in der Kindheit oder frühen Jugend und persistiert bei fehlenden Eradikationsmaßnahmen Jahrzehnte bis ein Leben lang (Yamaoka & Graham, 2014).

Um sich vor der schädigenden Einwirkung von Magensäure und Verdauungsenzymen zu schützen, entwickelte *H. pylori* diverse Schutzmechanismen. Das Bakterium besitzt verschiedene wichtige Enzyme, die ihm ein kurzzeitiges Überleben im Magenumen bei einem pH-Wert von bis zu zwei ermöglichen. Einen Anteil von ungefähr 15 % an dem von *H. pylori* produzierten Gesamtprotein bildet das im Zytoplasma lokalisierte Enzym Urease, welches aus den beiden Untereinheiten UreA und UreB aufgebaut ist. Sobald

sich das Bakterium in einem Umgebungsmedium mit einem pH-Wert niedriger als 6,5 befindet, öffnet sich in der zytoplasmatischen Membran ein Kanal, der den Einstrom von wirtseigenem Harnstoff ermöglicht. Dieser wird daraufhin durch das Enzym Urease zu Ammoniak und Kohlenstoffdioxid hydrolysiert, wodurch einströmende H^+ -Ionen gepuffert werden, der pH-Wert konstant bleibt und somit das Membranpotential aufrecht erhalten werden kann (Weeks et al., 2000). Ein weiteres wichtiges Enzym ist die im Periplasma lokalisierte α -Carboanhydrase. Sie katalysiert die Umwandlung von Bikarbonat und Protonen zu Kohlenstoffdioxid. H^+ -Ionen, die bei der Reaktion von Urease durch Dissoziation des frei werdenden Kohlenstoffdioxids entstehen, werden dadurch wieder abgepuffert (Smith & Ferry, 2000; Weeks et al., 2000). Um die gastrische Mukosa erfolgreich zu kolonisieren, muss *H. pylori* nicht nur dem sauren pH-Wert des Magenlumens, sondern auch der mechanischen Magenentleerung durch Peristaltik widerstehen. Chemotaktische Orientierung und eine starke Motilität durch Flagellenbewegung sind essentielle Faktoren, um ein Abdriften in das Magenlumen zu verhindern. Infolge der Sekretion von Bicarbonat-Ionen durch die Zellen der Magenschleimhaut entsteht ein pH-Gradient, den *H. pylori* zur Orientierung nutzt. Es wurde außerdem nachgewiesen, dass auch der durch die Epithelzellen produzierte Harnstoff von *H. pylori* wahrgenommen werden kann und dass dieser ebenfalls chemotaktisch wirksam ist (Huang et al., 2015; Yoshiyama & Nakazawa, 2000). Durch die Urease-bedingte Produktion von Ammoniak ist *H. pylori* weiterhin in der Lage, die Viskoelastizität der Schleimschicht zu reduzieren und dadurch seine eigene Beweglichkeit zu erhöhen (Celli et al., 2009) .

Der Großteil der Infektionen mit *H. pylori* bewirkt zwar eine lokale Entzündung der gastrischen Mukosa (Gastritis), verläuft aber klinisch vollständig asymptomatisch. In 10-15 % der Fälle kommt es jedoch zur Etablierung eines gastroduodenalen Ulkus, einer symptomatischen Gastritis oder eines Magenkarzinoms. Der Ort der Kolonisation scheint hierbei ein ausschlaggebender Faktor für den weiteren Krankheitsverlauf zu sein. Eine sich überwiegend im Antrum manifestierende Gastritis ist vornehmlich mit der Entwicklung eines duodenalen Ulkus assoziiert. Im Gegensatz dazu deutet eine sich im Korpus manifestierende Gastritis auf ein höheres Risiko für die Entwicklung eines

Magenulkus und eines Magenkarzinoms hin (Atherton, 2006; Ubukata et al., 2011). Wirtsfaktoren, die das Risiko für die Entwicklung eines Magenkarzinoms signifikant erhöhen, sind unter anderem das Patientenalter und Patientengeschlecht. Eine bereits in jungen Jahren erworbene *H. pylori* Infektion und das männliche Geschlecht wirken sich verstärkend auf die Entwicklung eines Magenkarzinoms aus (Blaser et al., 2007; Chen et al., 2016). In epidemiologischen Studien konnte nachgewiesen werden, dass auch Ernährung und Alkoholkonsum das Risiko beeinflussen, an einem Magenkarzinom oder gastroduodenalen Ulkus zu erkranken. Somit erhöht eine salzreiche und rohkostarme Ernährung das Risiko ein Magenkarzinom zu entwickeln um 12 %, regelmäßiger Alkoholkonsum um 5 %. Eine obstreiche Diät hingegen senkte das Risiko um 5 % (Fang et al., 2015). Bei Experimenten an mit *H. pylori* infizierten Wüstenrennmäusen konnte nachgewiesen werden, dass eine salzreiche Diät zu einer stärker ausgeprägten Gastritis sowie zur Generierung oxidativen Stresses führt. Es wurde vermutet, dass dieses Milieu die Selektion hin zu pathogenen *H. pylori*-Stämmen begünstigt (Loh et al., 2015). Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass Zigarettenkonsum das Risiko signifikant erhöht auch außerhalb des Respirationstrakts an diversen Karzinomen zu erkranken (Ordonez-Mena et al., 2016). In der Schleimhaut des Gastrointestinaltraktes bewirken die durch den Zigarettenrauch freigesetzten Toxine und Karzinogene eine verringerte Durchblutung, dämpfen die körpereigene Immunabwehr, erhöhen die Säuresekretion und verringern die Zellumsatzrate (Li et al., 2014). In Studien konnte gezeigt werden, dass Raucher öfter von einer Infektion mit *H. pylori* betroffen sind, der Krankheitsverlauf schwerwiegender ist, es häufiger zur Entstehung eines gastroduodenalen Ulkus kommt und der Heilungsverlauf komplizierter ist (Malfertheiner et al., 2017). Aber auch eine angeborene erhöhte Aktivität des Immunsystems, verursacht durch Gen-Polymorphismen, die zu einer verstärkten Expression von TLRs sowie einer gesteigerten Ausschüttung u. a. von IL-1 β , TNF α oder IL-10 führen, kann die Entwicklung von Dysplasien begünstigen (El-Omar et al., 2008).

Abgesehen von den Wirtsfaktoren hängt der Verlauf einer Infektion auch stark von dem infizierenden *H. pylori*-Stamm, insbesondere von dessen Virulenzfaktoren, ab.

1.2 Virulenzfaktoren von *Helicobacter pylori*

Helicobacter pylori weist eine Vielzahl von Virulenzfaktoren auf, die den Infektionsmechanismus stark prägen. Das bereits beschriebene Enzym Urease und die Motilität von *H. pylori*, bedingt durch seine helikale Form und mehrere unipolar angeordnete Flagellen, sind essentielle Faktoren, um eine Infektion erfolgreich zu etablieren. Die Fähigkeit, an Epithelzellen zu adhären und so einen Abtransport durch Peristaltik zu verhindern, ist ein weiterer Virulenzfaktor des Pathogens. Die Adhärenz wird über die Proteine BabA, SabA, OipA, AlpA/B und HopQ vermittelt (Backert et al., 2011; Belogolova et al., 2013; Odenbreit et al., 2009). Weiterhin sind die Toxine VacA (vakuolisierendes Cytotoxin A) und CagA (Cytotoxin-assoziiertes Antigen A) Virulenz-assoziiert. Letzteres ist zusammen mit einem Typ IV-Sekretionssystem (T4SS) auf der sogenannten *cag*-Pathogenitätsinsel (*cag*-PAI) kodiert.

1.2.1 Vakuolisierendes Cytotoxin A

Das vakuolisierende Cytotoxin A (VacA) ist ein porenbildendes Toxin, das die Ausbildung zytoplasmatischer Vakuolen in kultivierten Epithelzellen induziert (Leunk et al., 1988). Es wird zunächst von *H. pylori* als 140 kDa großes Prä-Protoxin produziert. Die N-terminal gelegene Signalsequenz führt zum Sec-abhängigen Transport vom Zytoplasma ins Periplasma. Hier katalysiert die am C-Terminus gelegene Autotransporter-Domäne die Translokation über die äußere Membran. Dort wird sie schließlich abgespalten und das nun 90 kDa große Toxin zu hexameren Ringen oligomerisiert (Foegeding et al., 2016; Junaid et al., 2016). Wenn VacA in Kontakt mit dem Magenepithel sowie den Säure und Magenschleim produzierenden Zellen kommt, zeigt es zahlreiche toxische Effekte. Darunter fallen die Induktion von Apoptose durch Freisetzung von Cytochrom C und die Zerstörung der Membranintegrität. Außerdem destabilisiert es die Wirtsabwehr indem es inhibierend auf die T-Zell-Aktivierung und deregulierend auf die Autophagozytose wirkt. Viele dieser Effekte gehen auf die Bildung anion-spezifischer Kanäle zurück, welche zunächst zu einem Einstrom von Chlorid-Ionen führen. Darauf folgt ein ausgleichender Protonen- und Wassereinstrom, wodurch der intrazelluläre Vesikeltransport gestört wird (Gebert et al., 2003; Kim & Blanke, 2012; Terebiznik et al., 2009).

1.2.2 Adhäsine

H. pylori produziert zahlreiche Adhäsine, darunter BabA, SabA, OipA, AlpA/B und HopQ. Durch diese Adhäsine kann das Bakterium einen engeren und stabileren Kontakt mit der Wirtszelle eingehen. Dies hat eine größere Exposition der Wirtszelle gegenüber anderen Virulenzfaktoren zur Folge, was auch zu stärkeren Entzündungssymptomen und stärkeren schädigenden Einflüssen auf die gastrische Mukosa des Wirts führt (Backert et al., 2011; Belogolova et al., 2013; Odenbreit et al., 2009). BabA (*blood group antigen-binding adhesin*) interagiert mit difucosyliertem Lewis^b-Blutgruppen-Antigen auf Epithelzellen und Muzinen und ist das bedeutendste Adhäsine bei der initialen Kolonisierung (Ilver et al., 1998). SabA (*sialic acid-binding adhesin*) stellt das vorherrschende Adhäsine bei Entzündungen im chronischen Stadium dar und interagiert mit Sialyl-Lewis^x-Antigen. Infektionen mit SabA produzierende *H. pylori*-Stämmen sind mit einem höheren Risiko zur Entwicklung eines gastrischen Karzinoms assoziiert (Mahdavi et al., 2002; Yamaoka et al., 2006). OipA (*outer membrane inflammatory protein*) produzierende *H. pylori*-Stämme hingegen werden nicht nur mit einem erhöhten Risiko zur Entwicklung eines gastrischen Karzinoms assoziiert, sondern auch mit einem gesteigerten Risiko für duodenale Ulcera (Yamaoka & Graham, 2014). Der genaue Mechanismus der Interaktion von HopQ (*Helicobacter outer membrane protein Q*) mit den auf der Wirtszelle exponierten CEACAM-Rezeptoren (*carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule*) ist noch nicht im Detail geklärt und bedarf noch weiterer Untersuchungen. Studien konnten jedoch belegen, dass die HopQ-CEACAM-Interaktion essentiell für die Translokation des Effektorproteins CagA ist. Es konnte auch gezeigt werden, dass CEACAM-Rezeptoren während des Durchlaufens einer chronischen Entzündung vermehrt von der Wirtszelle exprimiert werden, was einen erneuten Hinweis auf die perfekte Adaption und Entwicklung von Überlebensstrategien durch *H. pylori* in seiner ökologischen Nische liefert (Belogolova et al., 2013; Bonsor et al., 2018; Javaheri et al., 2016; Königer et al., 2016).

1.2.3 Die *cag*-Pathogenitätsinsel kodiert ein Typ IV-Sekretionssystem

Die *cag*-Pathogenitätsinsel ist ein 37 kb großer Genabschnitt im Genom *cag*-positiver (Typ 1) *H. pylori*-Stämme und maßgeblich für die Schwere des Verlaufs einer

H. pylori-Infektion verantwortlich. Sie enthält die genetischen Informationen für die Produktion des CagA-Proteins sowie für 26 bis 30 weitere Proteine; welche für den Zusammenbau eines Typ IV-Sekretionssystems (T4SS) zur Übertragung von CagA in die Wirtszelle nötig sind (Covacci et al., 1999; Odenbreit et al., 2000; Segal et al., 1999). T4SS sind vielschichtige Multiproteinkomplexe gramnegativer, grampositiver und einiger Archaeobakterien durch die sie befähigt sind, Makromoleküle über ihre Membranen hinweg zu transportieren. Anhand ihrer Funktion wurden sie in drei Kategorien unterteilt (Cascales & Christie, 2003). Die erste Kategorie beinhaltet die wohl am besten Untersuchten und zugleich verbreitetsten T4SS der gramnegativen Bakterien. Sie werden zum Transfer einzelsträngiger DNA in bakterielle und eukaryotische Zellen verwendet. Der am besten untersuchte Vertreter ist das VirB/D-System von *A. tumefaciens*, welches durch Translokation eines Nukleoprotein-Komplexes unkontrolliertes Wachstum in der pflanzlichen Zielzelle induziert (Christie, 2004). T4SS der zweiten Kategorie fungieren als Kontakt unabhängige Austauschsysteme, welche dazu genutzt werden DNA aus dem extrazellulären Raum aufzunehmen oder in diesen abzugeben, wie zum Beispiel das *H. pylori* ComB-System oder das GGI-System von *N. gonorrhoeae* (Ramsey et al., 2011; Stingl et al., 2010). Die dritte Gruppe beinhaltet T4SS die Effektorproteine in das Zytosol eukaryotischer Zellen transferieren, was unter anderem den Ablauf physiologischer Prozesse in der eukaryotischen Wirtszelle stört, aber für das T4SS-produzierende Bakterium einen Selektionsvorteil bietet. Vertreter dieser Gruppe sind das Dot/Icm-System von *L. pneumophila* oder das *H. pylori* Cag-System (Berger & Isberg, 1993; Odenbreit et al., 2000; Sadosky et al., 1993).

Das Cag-System von *H. pylori* weist einige strukturelle Homologien zu dem viel untersuchten Sekretionssystem von *Agrobacterium tumefaciens* auf, welches aus elf VirB-Proteinen (VirB1 bis VirB11) und einem Kopplungsprotein (NTPase VirD4) besteht. Die VirB-Proteine wurden in drei Gruppen unterteilt: Kernkomplex-Proteine (VirB6 bis VirB10), Pilus assoziierte Proteine (VirB2/3/5) und Energie erzeugende Proteine (NTPasen VirB4/11) (Tegtmeyer et al., 2011). Für alle VirB-Proteine und das VirD4 Protein konnten anhand der genetischen Sequenz Pendanten in den

cagPAI-Proteinen von *H. pylori* gefunden werden. Auch diese sind in Proteine des Kernkomplexes, welcher in die innere Membran und das Periplasma eingebettet ist, und Proteine der Pilus-Struktur, welche die äußere Membran durchquert, unterteilt.

Bisher wurden vier Effektormoleküle beschrieben, die durch das T4SS von *H. pylori* in die Wirtszelle transloziert werden: Peptidoglykanbruchstücke, DNA, Heptose-1,7-Bisphosphat bzw. ADP-Heptose und vor allem CagA (Gall et al., 2017; Odenbreit et al., 2000; Stein et al., 2017; Varga et al., 2016; Viala et al., 2004; Zhou et al., 2018; Zimmermann et al., 2017). CagA ist ein bakterielles Onkoprotein, welches nach Injektion in die Wirtszelle durch Src- und Abl-Kinasen an den C-terminal gelegenen EPIYA-Motiven (Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala) Tyrosin-phosphoryliert werden kann oder aber unphosphoryliert in der Wirtszelle verbleibt (Müller et al., 2012). Phosphoryliertes CagA aktiviert die zelluläre SHP-2 Phosphatase, wodurch morphologische Veränderungen des Zytoskeletts bewirkt werden und eine vermehrte Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B erfolgt. Daraufhin kommt es zur Produktion von IL-8 und einer gesteigerten Expression weiterer pro-inflammatorischer Gene (Müller et al., 2012; Selbach et al., 2009; Tegtmeyer et al., 2011). Unphosphoryliertes CagA dagegen zerstört *tight-junctions* zwischen Epithelzellen und führt zum Verlust der Zellpolarität (M. R. Amieva et al., 2003). Da die Zellpolarität eine unabdingliche Voraussetzung für die normale Zelldifferenzierung darstellt, ist bei fehlender Polarität unbegrenztes und undifferenziertes Wachstum möglich und damit die Möglichkeit der malignen Entartung gegeben. Patienten, die mit einem *cagA*-positiven *H. pylori*-Stamm infiziert sind, haben somit ein fünffach erhöhtes Risiko ein Adenokarzinom zu entwickeln. Dies steht im Vergleich zu einem zweifach erhöhten Risiko bei der Infektion mit einem *cagA*-negativen Stamm (Parsonnet et al., 1997).

1.2.3.1 Kernkomplex des *cagT4SS* von *H. pylori*

Die bisherige Studienlage deutet darauf hin, dass der intrabakteriell gelegene Kernkomplex des *cagT4SS* aus den folgenden beiden Teilen aufgebaut ist: Ein im Periplasma und der äußeren Membran verankerter Anteil, der hauptsächlich aus Cag3, CagM, CagT, CagX und CagY besteht, sowie ein in der inneren Membran verankerter Anteil, der aus CagE, CagW und CagV besteht (Backert et al., 2015; Kutter et al., 2008;

Pinto-Santini & Salama, 2009). In einer kürzlich durchgeführten Studie von Frick-Cheng et al. konnte der *cagT4SS*-Kernkomplex von der bakteriellen Membran abgelöst und anschließend elektronenmikroskopisch dargestellt werden. Hierbei zeigte sich der Aufbau des Proteinkomplexes aus Cag3, CagM, CagT, CagX und CagY. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass dieser ohne Kontakt zu einer potentiellen Wirtszelle in der Bakterienmembran produziert wird. Der Kernkomplex ist aus einem inneren und einem äußeren Ring aufgebaut, welche über eine speichenähnliche Struktur miteinander verbunden sind (Frick-Cheng et al., 2016). Ein direkt mit dem Kernkomplex interagierendes und daher für dessen Funktionsausübung essentielles Protein ist das an der inneren Membran lokalisierte CagF, welches als Chaperon mit dem Effektorprotein CagA in Wechselwirkung tritt und so dessen Translokation in die Wirtszelle ermöglicht (Couturier et al., 2006; Pattis et al., 2007).

1.2.3.2 Pilus des *cagT4SS* von *H. pylori*

Der extrabakteriell gelegene Anteil des *cagT4SS* stellt einen Pilus dar, der eine Verbindung zwischen Bakterien- und Wirtszelle bilden kann. Unter Eisenmangelbedingungen werden vermehrt Pili produziert, bei Mangel an Zink-Ionen hingegen ist die Expression verringert (Gaddy et al., 2014; Haley et al., 2014; Kwok et al., 2007; Noto et al., 2013; Rohde et al., 2003; Tanaka et al., 2003). CagA konnte durch elektronenmikroskopische Aufnahmen an der Spitze der Pili nachgewiesen werden. Daraus wurde der Rückschluss gezogen, dass CagA durch die Pili in die Wirtszelle transloziert wird (Kwok et al., 2007). Außerdem gibt es Hinweise dafür, dass CagH, CagI und CagL direkt an der Pilus-Bildung beteiligt sind, miteinander interagieren und für die erfolgreiche Translokation von CagA in die Wirtszelle benötigt werden (Backert et al., 2011; Fischer, 2011; Pham et al., 2012; Shaffer et al., 2011). CagH, CagI und CagL weisen ein gemeinsames C-terminales Sequenzmotiv auf. Durch Deletion dieses Motivs, welches sechs Aminosäuren umfasst, bleibt bei Betrachtung der CagI Δ 6C- und CagL Δ 6C-Mutanten die Pilus-Produktion komplett aus und es findet keine Translokation von CagA statt. Bei Deletion des CagH-Sequenzmotivs hingegen findet eine Pilus-Produktion zwar immer noch statt, diese erscheinen jedoch stark verlängert und verdickt. Dies legt die Vermutung nahe, dass CagI und CagL Bauelemente der Pili

sind und CagH bei deren korrektem Zusammenbau eine Art Kontrollfunktion einnimmt (Shaffer et al., 2011). Es konnte nachgewiesen werden, dass CagL an der Pilus-Spitze lokalisiert ist und dort mit den auf der Wirtszelle verankerten Integrinen interagiert (Backert et al., 2008; Kwok et al., 2007). Integrine sind eine heterologe Gruppe von Transmembranproteinen, die aus α - und β -Einheiten aufgebaut und für die Adhäsion an die extrazelluläre Matrix essentiell sind (Luo et al., 2007). Viele Integrine erkennen ihren Interaktionspartner über das sogenannte RGD-Motiv (Arg-Gly-Asp), welches auch in CagL enthalten ist (Takagi, 2004). Es konnte eine höhere Affinität der Integrine zu CagL als zur CagL Δ RGD-Mutante nachgewiesen werden, was die bedeutsame Rolle des RGD-Motivs unterstreicht (Kwok et al., 2007). Bisher konnte eine Interaktion von CagL mit den Integrinen $\alpha 5\beta 1$, $\alpha V\beta 6$, $\alpha V\beta 5$, $\alpha V\beta 3$ und $\alpha V\beta 8$ nachgewiesen werden (Barden & Niemann, 2015; Conradi et al., 2012; Jimenez-Soto et al., 2009; Koelblen et al., 2017; Kwok et al., 2007; Wiedemann et al., 2012). Auch für das Effektormolekül CagA konnte eine Interaktion mit Integrinen auf der Oberfläche der Wirtszelle nachgewiesen werden (Jimenez-Soto et al., 2009). Im Gegensatz zu der bereits beschriebenen Interaktion des *H. pylori*-Oberflächenproteins HopQ mit den CEACAMs hat diese Interaktion jedoch nur eine geringe Bedeutung für die Translokation von CagA in die Zielzelle (Zhao et al., 2018).

1.3 Zielsetzung

Das gram-negative Bakterium *Helicobacter pylori* besiedelt den menschlichen Magen und ist einer der weltweit häufigsten bakteriellen Infektionserreger. Die Schwere der Erkrankung, welche von der Ausbildung einer Gastritis bis zur Entwicklung eines Magenkarzinoms variiert, korreliert unter anderem mit dem Vorhandensein der *cag*-Pathogenitätsinsel im Genom einiger *H. pylori*-Stämme. Durch diese wird das Bakterium zur Produktion des Onkoproteins CagA und eines Typ IV-Sekretionssystems befähigt. Trotz gemeinsamer Merkmale mit anderen T4SS, weist das Sekretionssystem von *H. pylori* mehrere, zum Teil einzigartige, Proteine auf, deren Funktion es noch zu klären gilt. Im Fokus dieser Arbeit stehen die auf der *cag*-Pathogenitätsinsel kodierten Proteine CagH und CagL sowie deren Interaktion mit CagI. Alle drei Proteine erwiesen

sich in vorhergehenden Studien sowohl für die Translokation des Effektorproteins CagA als auch für die Synthese der Apparatsstruktur als essentiell. Jedoch scheinen nur CagI und CagL als Bauelemente direkt am Aufbau des Pilus beteiligt zu sein. CagH hingegen scheint eine Kontrollfunktion bei dessen korrektem Zusammenbau einzunehmen (Backert et al., 2011; Fischer, 2011; Pham et al., 2012; Shaffer et al., 2011). Die genaue Lokalisation der drei Proteine in den verschiedenen Zellkompartimenten sowie ihre Funktion konnte jedoch immer noch nicht ausreichend geklärt werden. Bisher liegen keine ausreichend spezifischen Antikörper für diese Proteine vor. Um sie besser untersuchen zu können, sollten in der hier vorliegenden Arbeit *H. pylori*-Mutanten, welche die Proteine CagH und CagL mit einem fusionierten Epitop-Tag produzieren, erzeugt und ein Protokoll, mit dem die Proteine auf der Bakterienzelle visualisiert werden können, erarbeitet werden. Der Epitop-Tag sollte, um zelluläre Funktionen nicht zu stören, möglichst klein, per Immunfluoreszenz detektierbar und für *Pull-Down-Assays* nutzbar sein. Außerdem sollten weitere Informationen über die strukturellen Grundlagen der CagH-CagL-Interaktion durch Charakterisierung möglicher funktioneller Domänen von CagH erlangt werden. Die durchgeführten Untersuchungen sollen einen Beitrag zum besseren Verständnis der Funktionsweise der Proteine CagH, CagI und CagL liefern und somit dazu beitragen, das Typ IV-Sekretionssystem von *H. pylori* in seiner gesamten Komplexität zu verstehen.

2 Material

2.1 Bakterienstämme

2.1.1 Verwendete *E. coli*-Stämme

| Stamm | Eigenschaften/Genotyp | Referenz |
|----------------------|--|--|
| <i>E. coli</i> TOP10 | F- <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74 recA1 araD139</i> Δ (<i>araleu</i>)7697 <i>galU galK rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1 nupG</i> | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA |

2.1.2 Verwendete *H. pylori*-Stämme

| Stamm | Eigenschaften/Genotyp | Referenz |
|---------------------------|--|------------------------|
| P12 | Wild-Typ; Klinisches Isolat (888-0) eines Patienten der Universität Hamburg mit Ulcus duodeni im Jahr 1994 | (Schmitt & Haas, 1994) |
| P12 [HA-CagH] [myc-CagL] | P12 Δ <i>cagHIL</i> (pWS567), <i>HA-cagH-cagI</i> (pAM4), <i>myc-cagL</i> (pWS569); Cam ^R , Erm ^R , Kan ^R | diese Arbeit |
| P12 [M45-CagH] [myc-CagL] | P12 Δ <i>cagHIL</i> (pWS567), <i>M45-cagH-cagI</i> (pAM3), <i>myc-cagL</i> (pWS569), Cam ^R , Erm ^R , Kan ^R | diese Arbeit |
| P12 [myc-CagL] | P12 Δ <i>cagL</i> (pWS290), <i>myc-cagL</i> (pWS569), Cam ^R , Kan ^R | W. Fischer |

| | | |
|--------------------------------------|--|-----------------------|
| P12 [Q-CagH] | P12 $\Delta cagH$ (pWS423), <i>Q-cagH</i> (pAM01), Cam ^R , Erm ^R | diese Arbeit |
| P12 [Q-CagL] | P12 $\Delta cagL$ (pWS290), <i>Q-cagL</i> (pAM02), Cam ^R , Kan ^R | diese Arbeit |
| P12 $\Delta cagH$ | P12 $\Delta cagH$ (pWS423), Erm ^R | W. Fischer |
| P12 $\Delta cagHIL$ | P12 $\Delta cagHIL$ (pWS567), Erm ^R | W. Fischer |
| P12 $\Delta cagL$ | P12 $\Delta cagL$ (pWS290), Cam ^R | W. Fischer |
| RNP3 | P12 [TEM-CagA] | R. Nair, W. Fischer |
| RNP3 [CagH] [myc-CagH $\Delta 26N$] | RNP3, <i>myc-cagH</i> $\Delta 26N$ (pWS660), Cam ^R | diese Arbeit |
| RNP3 [CagH] [myc-CagH $\Delta 52N$] | RNP3, <i>myc-cagH</i> $\Delta 52N$ (pWS661), Cam ^R | diese Arbeit |
| RNP3 [CagH] [myc-CagH] | RNP3, <i>myc-cagH</i> (pWS538), Cam ^R | diese Arbeit |
| RNP3 [HA-CagH] [myc-CagL] | RNP3 $\Delta cagHIL$ (pWS567), <i>HA-cagH-cagI</i> (pAM4), <i>myc-cagL</i> (pWS569); Cam ^R , Erm ^R , Kan ^R | diese Arbeit |
| RNP3 [M45-CagH] [myc-CagL] | RNP3 $\Delta cagHIL$ (pWS567), <i>M45-cagH-cagI</i> (pAM3), <i>myc-cagL</i> (pWS569); Cam ^R , Erm ^R , Kan ^R | diese Arbeit |
| RNP3 [myc-CagH $\Delta 26N$] | RNP3 $\Delta cagH$ (pWS423), <i>myc-cagH</i> $\Delta 26N$ (pWS660), Cam ^R , Erm ^R | W. Fischer , E. Weiss |

| | | |
|------------------------------|---|-----------------------|
| RNP3 [myc-CagH Δ 52N] | RNP3 Δ cagH (pWS423), <i>myc-cagH</i> Δ 52N (pWS661), Cam ^R , Erm ^R | W. Fischer , E. Weiss |
| RNP3 [myc-CagH] | RNP3 Δ cagH (pWS423), <i>myc-cagH</i> (pWS538), Cam ^R , Erm ^R | W. Fischer , E. Weiss |
| RNP3 Δ cagT | P12 [TEM-CagA] Δ cagT (pJP95), Cam ^R | W. Fischer |

2.2 Nährmedien für Bakterien

| | |
|----------------------------------|---|
| Brucella-Medium | 28 g/l Brucella Broth (BD, Franklin Lakes, USA), autoklaviert |
| <i>E. coli</i> -Einfriermedium | 80 % LB, 20 % Glycerin |
| <i>E. coli</i> -Flüssigkultur | 100 % LB |
| <i>H. pylori</i> -Flüssigkultur | 90 % BB, 10 % FCS |
| <i>H. pylori</i> -Einfriermedium | 70 % BB, 20 % FCS, 10 % Glycerin |
| LB-Medium | 20 g/l Lennox-L-Medium (Gibco/Invitrogen, Carlsbad, USA), autoklaviert |
| LB-Platten | 32 g/l Lennox-L-Agar (Gibco/Invitrogen, Carlsbad, USA), autoklaviert |
| Serum-Platten | 36 g/l GC-Agar-Base (Oxoid, Darmstadt, Deutschland), autoklaviert, danach Zugabe von 10 ml/l Vitamin-Mix und 80 ml/l Pferdeserum |
| Vitaminmix | 100 g/l α -D-Glucose, 10 g/l L-Glutamin, 26 g/l L-Cystein, 0,1 g/l Cocarboxylase, 20 mg/l Fe(III)-Nitrat, 3 mg/l Thiamin, 13 mg/l p-Aminobenzoessäure, 0,25 g/l |

| | |
|--|---|
| | Nicotinamidadenindinucleotid (NAD), 10 mg/l Vitamin B12, 1,1 g/l L-Cystin, 1 g/l Adenin, 30 mg/l Guanin, 0,15 g/l L-Arginin, 0,5 g/l Uracil |
|--|---|

2.3 Antibiotika

| Hemmstoff | Lösungsmittel | Konzentration | Hersteller/Lieferant |
|-----------------------|------------------|---|-------------------------------|
| Chloramphenicol (Cam) | EtOH | 30 mg/l (<i>E. coli</i>) 6 mg/l (<i>H. pylori</i>) | Merck, Darmstadt, Deutschland |
| Kanamycin (Kan) | H ₂ O | 50 mg/l (<i>E. coli</i>) 8 mg/l (<i>H. pylori</i>) | Merck, Darmstadt, Deutschland |

2.4 Verwendete Zelllinien

| | |
|-----|---|
| AGS | Humane Magenadenokarzinom-Zelllinie (ATCC CRL-1739) |
|-----|---|

2.5 Zellkulturmedien und -puffer

| | |
|---------------------------------|--|
| DMSO | Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA |
| DPBS | Gibco/Invitrogen, Carlsbad, USA |
| RPMI Medium 1640 mit L-Glutamin | Gibco/Invitrogen, Carlsbad, USA |
| Trypsin/EDTA | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA |

2.6 Plasmide

| | | |
|-------|--|--------------|
| pAM01 | alpA-Promotor, Q- <i>cagH</i> , Cam ^R , Kan ^R (Integration in das endogene <i>H. pylori</i> Plasmid pHel12) | diese Arbeit |
| pAM02 | cagA-Promotor, Q- <i>cagL</i> , | diese Arbeit |

| | | |
|--------|---|-----------------------------|
| | Amp ^R , Kan ^R (Integration in <i>recA</i> -Locus) | |
| pAM03 | alpA-Promotor, M45- <i>cagH-cagI</i> , Cam ^R , Kan ^R (Integration in pHel12) | diese Arbeit |
| pAM04 | alpA-Promotor, HA- <i>cagH-cagI</i> , Cam ^R , Kan ^R (Integration in pHel12) | diese Arbeit |
| pLH02 | cat, alpA-Promotor, BabA, Cam ^R , Kan ^R (Integration in pHel12) | L. Holsten |
| pWS255 | cagA-Promotor, <i>cagL</i> , Amp ^R , Kan ^R (Integration in <i>recA</i> -Locus) | (Jimenez-Soto et al., 2009) |
| pWS290 | $\Delta cagL::cat$, Cam ^R | (Jimenez-Soto et al., 2009) |
| pWS423 | $\Delta cagH::rpsL-erm$, Erm ^R | W. Fischer |
| pWS538 | alpA-Promotor, myc- <i>cagH</i> , Cam ^R (Integration in pHel12) | W. Fischer |
| pWS546 | alpA-Promotor, <i>cagH-cagI-cagL</i> , Cam ^R , Erm ^R (Integration in pHel12) | W. Fischer |
| pWS567 | $\Delta cagHIL::rpsL-erm$, Amp ^R , Erm ^R | W. Fischer |
| pWS569 | cagA-Promotor, myc- <i>cagL</i> , Amp ^R , Kan ^R (Integration in <i>recA</i> -Locus) | W. Fischer |
| pWS660 | alpA-Promotor, myc- <i>cagH</i> $\Delta 26N$, Cam ^R , Erm ^R (Integration in pHel12) | W. Fischer |

| | | |
|--------|--|------------|
| pWS661 | alpA-Promotor, myc- <i>cagH</i> $\Delta 52N$, Cam ^R , Erm ^R (Integration in pHel12) | W. Fischer |
|--------|--|------------|

2.7 Oligonukleotide

| Name | Sequenz (5' → 3') | Restriktionsenzym, Eigenschaften | Verwendung |
|-------|---|--|--|
| AM1 | ACT AGC ATA TGG ATA GGA GCA GGG ATC GTT TGC CGC CTT TTG AAA CAG AAA CCA GGA TCT TAG CAG GTA CAC AAG CTA TAT ATG | M45-Tag, <i>cagH</i> , <i>Nde I</i> | pAM03 |
| AM2 | ACT AGC ATA TGT ATC CTT ACG ACG TGC CTG ATT ATG CGG CAG GTA CAC AAG CTA TAT ATG | HA-Tag, <i>cagH</i> , <i>Nde I</i> | pAM04 |
| IB60 | GAC TGA AAT GCC TCA AAA TG | cat-Kasette | Sequenzierprimer für Plasmid-Integration |
| WS158 | CCA TCG ATG GTA AAA ATG TGA ATC GT | <i>cagA</i> -Promotor | Sequenzierprimer für <i>recA</i> -Integration |
| WS638 | A TGC GGC CGC TCA CTT CAC GAT TAT TTT AGT TTG | <i>Not I</i> , <i>cagH</i> | pAM01, pWS538, pWS660, pWS661 |
| WS643 | ATC TTC TGC CAT CAA AAC AGA C | <i>cagL</i> | pAM02 |
| WS650 | ACT AGC ATA TGG | <i>Nde I</i> , myc-Tag, | pWS538 |

| | | | |
|-------|---|---|-----------------|
| | AAC AAA AAC TCA TCT CAG AAG AGG ATC TGG CAG GTA CAC AAG CTA TAT ATG | <i>cagH</i> | |
| WS662 | GGA CAA CAG CAA TTA GGG ATA ACA AGC GGC TTA AAG CAA C | Q-Tag, <i>cagL</i> | pAM02 |
| WS663 | ACT AGC ATA TGG CAG GAG GAC AAC AGC AAT TAG GGG CAG GTA CAC AAG CTA TAT ATG | <i>Nde I</i> mit Q-Tag, <i>cagH</i> | pAM01 |
| WS672 | TAG CGG CCG CGT CGA CTC ATT TGA CAA TAA CTT TAG AGC | <i>Not I</i> , <i>cagI</i> | pAM03 und pAM04 |
| WS791 | ACT AGC ATA TGG AAC AAA AAC TCA TCT CAG AAG AGG ATC TGA GTG GTG TTG CAG GGC CA | <i>Nde I</i> , myc-Tag, <i>cagH</i> Δ26N | pWS660 |
| WS792 | ACT AGC ATA TGG AAC AAA AAC TCA TCT CAG AAG AGG ATC TGA CTA ATC CGC AAA TGA CCG CT | <i>Nde I</i> , myc-Tag, <i>cagH</i> Δ52N | pWS661 |

2.8 Proteine und Enzyme

| | |
|-----------|---|
| Proteine: | Alkalische Phosphatase (AP)-gekoppeltes Protein A (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) |
| | ANTI-c-Myc Agarose-beads (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) |
| | Fetales Kälberserum (FCS) (PAA, Pasching, Österreich) |
| | Pferdeserum HyClone (GE-Healthcare, Buckinghamshire, Vereinigtes Königreich) |
| | Protein G-Agaros (Roche Applied Science, Penzberg, Deutschland) |
| | Rinderserumalbumin (BSA) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) |
| Enzyme: | gpTransglutaminase (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) |
| | Lysozym (Roche Diagnostics, Rotkreuz, Schweiz) |
| | Restriktionsenzyme (Roche Diagnostics, Rotkreuz, Schweiz) |
| | RNAse (Qiagen, Venlo, Niederlande) |
| | T4 DNA ligase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) |
| | Takara-Ex Taq-Polymerase (TaKaRa Bio Inc., Otsu, Japan) |

2.9 Antikörper

Tabelle 1: Primäre Antikörper

| Zielprotein (α -) | Eigenschaften | Verdünnung | Referenz, Hersteller |
|---------------------------|--|------------------------|--|
| IL-8 | Monoklonaler Antikörper gegen humanes Interleukin 8 (Maus) | nach Herstellerangaben | Human IL-8 ELISA Set (BD Biosciences, Franklin Lakes, USA) |
| α -CagA (AK 299) | polyklonaler Antikörper gegen das CagA EPIYA | 1:1.000 | (Schindele et al., 2016) |

| | | | |
|---|---|---------|--|
| | Motiv (Kaninchen) | | |
| α -CagC (Anti 546) | polyklonaler Antikörper gegen CagC (Kaninchen) | 1:1.000 | (Kutter et al., 2008) |
| α -CagH (Anti 541) | polyklonaler Antikörper gegen CagH (Kaninchen) | 1:1.000 | K. T. Pham |
| α -CagI (Anti 540) | polyklonaler Antikörper gegen CagI (Kaninchen) | 1:2.000 | (Pham et al., 2012) |
| α -CagL (Anti 539/AK271)) | polyklonaler Antikörper gegen CagL (Kaninchen) | 1:1.000 | (Kutter et al., 2008) |
| α - <i>H. pylori</i> (AK 175) | polyklonaler Antikörper gegen Oberflächenproteine von <i>H. pylori</i> (Kaninchen) | 1:400 | (Odenbreit et al., 2000) |
| α -HA | monoklonaler Antikörper gegen HA <i>Epitope tag</i> (Maus) | 1:1.000 | Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA |
| α -M45 | monoklonaler Antikörper gegen M45 <i>Epitope tag</i> (Maus) | 1:100 | (Obert et al., 1994) |
| α -Myc | monoklonaler Antikörper gegen Myc <i>Epitope tag</i> (Maus) | 1:1.000 | Cell Signalling Technology, USA |
| α -p-Tyr (4G10) | monoklonaler Antikörper gegen Tyrosin- phosphorylierte Proteine (Maus) | 1:100 | Millipore, Schwalbach, Deutschland |

Tabelle 2: Sekundäre Antikörper

| Zielprotein (α-) | Eigenschaften | Verdünnung | Referenz, Hersteller |
|---|--|-------------------|--|
| α -Maus Alexa Fluor® 488 | Alexa 488-gekoppelter polyklonaler Antikörper gegen Maus-IgG (Ziege) | 1:1.000 | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA |
| α -Maus Alexa Fluor® 555 | Alexa 555-gekoppelter oligoklonaler Antikörper gegen Maus-IgG (Ziege) | 1:1.000 | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA |
| α -Maus Alexa Fluor® 647 | Alexa 647-gekoppelter polyklonaler Antikörper gegen Maus-IgG (Ziege) | 1:1.000 | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA |
| α -Maus IgG-AP | Alkalische Phosphatase (AP)-gekoppelter monoklonaler Antikörper gegen Maus-IgG (Ziege) | 1:10.000 | Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA |
| α -Maus IgG-POX | Meerrettichperoxidase (POX)-gekoppelter polyklonaler Antikörper gegen Maus-IgG (Ziege) | 1:10.000 | Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA |

2.10 Verwendete Molekulargewichtsmarker

| | |
|---------------------------------|---|
| DNA-Gelelektrophorese | GeneRuler 1 kb DNA Ladder, SM0313 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) |
| Polyacrylamid-Gelelektrophorese | PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 26619 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) |
| | PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 26617 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) |

2.11 Lösungen und Puffer

| | |
|-----------------------------------|---|
| „gp-Transglutaminase-Puffer“ | 20 mM HEPES, pH 8,2 10 mM MgCl ₂ 0,1 mM EGTA 5 mM CaCl ₂ |
| Coomassie-Entfärbelösung | 7,5 % CH ₃ COOH 10 % MeOH 10 % EtOH |
| Coomassie-Färbelösung | 7,5 % CH ₃ COOH 10 % MeOH 10 % EtOH 0,1 % Coomassie Brilliant Blue R250 (Biomol) |
| GEBS | 20 % Glycerin 50 mM EDTA 0,05 % Bromphenolblau 0,5 % Sarcosyl (N-Lauryl-Sarcosin), pH 8,0 |
| Ligase-Puffer (10x) | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA |
| Milchpulver-Lösung 5 % | 5 g Milchpulver, fettarm (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland), auf 100 ml TBS-Tween 0,5 % auffüllen |
| PBS (1x) | 27 mM KCl 1,38 M NaCl 15 mM KH ₂ PO ₄ 80 mM Na ₂ HPO ₄ |
| PBS-Tween 0,1 % | 999 ml 1x PBS 1 ml Tween 20 |
| Puffer „A“ für Restriktionsenzyme | Roche Applied Science, Penzberg, Deutschland |

| | |
|---|--|
| Puffer „H“ für Restriktionsenzyme | Roche Applied Science, Penzberg, Deutschland |
| Puffer „O“ für Restriktionsenzyme | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA |
| RIPA | 50 mM Tris-HCl, pH 7,4 150 mM NaCl 1 mM EDTA 1 % (v/v) Nonidet P-40 0,25 % (v/v) Sodiumdesoxycholat |
| SDS Elektrophoresepuffer (5x) | 25 mM Tris 250 mM Glycin auf 4,5 l Aqua dest. auffüllen, pH 8,3 Zugabe 20 % SDS auf 5 l Aqua dest. auffüllen |
| SDS-Probenpuffer (2x) | 100 mM Tris-HCl pH 6,8 4 % (w/v) SDS 20 % (v/v) Glycerin 0,2 % (w/v) Bromphenolblau |
| STET | 50 mM Tris-HCl, pH 8,0 50 mM EDTA 8 % (w/v) Sucrose 5 % (v/v) Triton X-100 |
| TAE (50x) | Tris 242 g 90 % CH ₃ COOH 0,5 M EDTA, pH 8,0 |
| TBS (10x) | 150 mM NaCl 200 mM Tris-HCl, pH 7,5 |
| TBS-Tween 0,5 % | 100 ml 10x TBS 0,5 ml Tween 20 auf 1 l Aqua dest. auffüllen |
| Tfbl-Puffer (steril filtriert, pH 5,8): | 30 mM Kaliumacetat |

| | |
|--|---|
| | 100 mM Rubidiumchlorid (RbCl) 10 mM Calciumchlorid (CaCl ₂) 50 mM Manganchlorid (MnCl ₂) 15 % (v/v) Glycerol |
| TfbII-Puffer (steril filtriert, pH 6,5): | 10 mM 3-(N-Morpholino)propansulfonsäure 10 mM Rubidiumchlorid (RbCl) 75 mM Calciumchlorid (CaCl ₂) 15 % (v/v) Glycerol |
| Tris-HCl pH 6,8 und | 1 M Tris mit 37 % Tris-HCl |
| pH 8,8 und | 1,5 M Tris mit 37 % Tris-HCl |
| pH 8,0 und | 1 M Tris mit 37 % Tris-HCl |
| pH 9,6 | 0,1 M Tris mit 37 % Tris-HCl |
| Western-Transferpuffer: | |
| Anode I-Puffer: | 300 mM Tris-HCl, pH 10,4 10 % Methanol |
| Anode II-Puffer: | 25 mM Tris-HCl, pH 10,4 10 % Methanol |
| Kathode-Puffer: | 25 mM Tris-HCl, pH 9,6 40 mM 6-Aminocapronsäure 10 % Methanol |

Durch einen Stern (*) wird die Zugabe von Protease-Inhibitoren Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF, 1mM), Leupeptin (1µM) und Pepstatin (1µM) gekennzeichnet.

2.12 Chemikalien

| | |
|--|--|
| Acrylamid/Bisacrylamid (Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1)) | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| Agarose | Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA |
| Aminocaprinsäure (ACA) | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| Ammoniumpersulfat | Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA |
| BCIP (5-Brom-3-chlor-indolylphosphat-p-Toluidinsalz) | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| B-Mercaptoethanol | Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA |
| Coomassie Brilliant Blue R250 | Biomol, Hamburg, Deutschland |
| DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) | Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA |
| Desoxyribonukleinsäure-(dNTP-) Mix | MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland |
| DMF (N,N-Dimethylformamid) | Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA |
| EDTA (Ethyldiamintetraacetat) | Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA |
| Essigsäure | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| Ethanol reinst | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| Ethidiumbromid | Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA |
| FITC-Cadaverin | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA |
| Glycerin | Gibco/Invitrogen, Carlsbad, USA |
| Isopropanol | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| Leupeptin | Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA |
| Lysozym | Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA |
| Magnesiumchlorid $MgCl_2$ | Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA |
| Methanol | Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA |
| Methylenblau | Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA |
| NBT (Nitroblau-Tetrazoliumchlorid) | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| Pepstatin A | Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA |
| PFA (Paraformaldehyd) | Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA |
| PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid) | Merck, Darmstadt, Deutschland |

| | |
|--|---------------------------------|
| Probenecid | Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA |
| SDS (Natrium-Dodecyl-Sulfat) | Serva, Heidelberg, Deutschland |
| TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylendi- amid) | Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA |
| Tris | MP Biomedicals, Santa Ana, USA |
| Triton X-100 | Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA |
| Tween 20 | Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA |

2.13 Kommerzielle Kits

| | |
|--|---|
| Human IL-8 ELISA Set, BD OptEIA™ | BD Biosciences, Franklin Lakes, USA |
| illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit™ | GE-Healthcare, Buckinghamshire, Vereinigtes Königreich |
| LiveBLAzer™-FRET B/G Loading Kit | Invitrogen, Carlsbad, USA |
| QIAamp DNA Mini Kit® | Qiagen, Venlo, Niederlande |
| QIAprep Spin Miniprep Kit® | Qiagen, Venlo, Niederlande |

2.14 Verbrauchsmaterialien

| | |
|---|---|
| 12-Well Costar® Zellkulturplatten | Corning Inc., Corning NY, USA |
| 24-Well Costar® Zellkulturplatten | Corning Inc., Corning NY, USA |
| 96-Well Costar® Zellkulturplatten, schwarz, durchsichtiger Boden | Corning Inc., Corning NY, USA |
| 96-Well Mikrotiterplatten Nunc™ MicroWell™ | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA |
| DAKO fluorescent mounting medium | Dako North America Inc, Carpinteria, USA |
| Deckgläser, rund, 12 mm | A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland |
| Einmalküvetten | Brand GmbH, Wertheim, Deutschland |
| Einmalpipette Costar®Stripette, 5 ml, | Corning Inc., Corning NY, USA |

| | |
|---|---|
| 10 ml, 25 ml, 50 ml | |
| Einmalspitzen, verschiedene Größen | Sarstedt, Nürmbrecht, Deutschland |
| Einmalspritzen Omnifix® 50 ml | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| Falcon Röhrchen 15 ml, 50 ml | BD Biosciences, Franklin Lakes, USA |
| Filterpapier Nitrocellulose | Millipore, Billerica, USA |
| Filterpapier Whatman® | Whatman, Brentford, Vereinigtes Königreich |
| Kryoröhrchen Nalgene™ 1,5 ml | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA |
| Objektträger | Marienfeld Paul GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland |
| Parafilm® M | Bemis Company Inc., Neenah, USA |
| Pasteurpipetten, Volac® | Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA |
| Petrischale | Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich |
| PVDF Membran | Bio-Rad, Hercules, USA |
| Reaktionsgefäß für Ultrazentrifuge | Beckman Coulter Inc., Fullerton, USA |
| Reaktionsgefäß, safe-lock, 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml | Eppendorf, Hamburg, Deutschland |
| Röntgenfilme | Fuji Film, Düsseldorf, Deutschland |
| Sterilfilter 0,2 µm | Millipore, Schwalbach, Deutschland |
| Wasser doppelt destilliert | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| Wattestäbchen, steril | Deltalab, Barcelona, Spanien |
| Zellkulturflaschen Falcon® Canted Neck, 250 ml | Corning Inc., Corning NY, USA |

2.15 Geräte und Apparaturen

| | |
|---|-------------------------------|
| Agarose-Gelkammern | BioRad, Hercules, USA |
| Anaerobenbrutschrank Mikroinkubator MI22C | Scholzen, Wittenbach, Schweiz |

| | |
|--|--|
| Anaerobiertopf | Fritz Gößner GmbH, Hamburg, Deutschland |
| Blot-Apparatur <i>semi-dry</i> | Biotech Fischer, Reiskirchen, Deutschland |
| Brutschrank 37 °C | WTB Binder, Tuttlingen, Deutschland |
| CO ₂ -Inkubator HERAcell® 150i | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA |
| Geldokumentationssystem ChemiDoc™ MP Imaging System | BioRad, Hercules, USA |
| Gelkammer Mini-PROTEAN 2 | BioRad, Hercules, USA |
| Magnetrührer MR 3000 | Heidolph, Schwabach, Deutschland |
| Mikroskope: Konfokal Mikroskop Leica TCS SP 5 II Fluoreszenzmikroskop Leica DM IRB | Leica, Mannheim, Deutschland Leica, Mannheim, Deutschland |
| Mikrotiterplatten-Lesegeräte: GENios CLARIOstar® | Tecan, Männedorf, Schweiz BMG LABTECH, Ortenberg, Deutschland |
| pH-Meter ProfiLine pH197i | WTW, Weilheim, Deutschland |
| Pipetten: Mikroliterpipette Transferpette S PIPETMAN® P10, P20, P200, P1000 Stripettor™ Ultra. Pipet Controller | Brand GmbH, Wertheim, Deutschland Gilson, Middleton, USA Corning Inc., Corning NY, USA |
| Schüttelinkubator Thermomixer compact | Eppendorf, Hamburg, Deutschland |
| Schüttelinkubator CERTOMAT® IS | B. Braun Biotech International, Göttingen, Deutschland |
| Spannungsquellen PowerPac 300, Power Pac Universal | BioRad, Hercules, USA |
| Spektrophotometer DR/2000 | Hach, Bremen, Deutschland |
| Sterilbank | BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH, Sonnenbühl-Genkingen, Deutschland |
| Thermocycler peqSTAR | Peqlab Ltd., Fareham, Vereinigtes |

| | |
|---|---|
| | Königreich |
| Ultraschallgerät Sonifier 450 | Branson Ultrasonics™, Danbury, USA |
| Vortex Genie 2 | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA |
| Wasserbad 1012 | GFL, Burgwedel, Deutschland |
| Zentrifugen: Centrifuge 5424 R Megafuge 16 R, Megafuge 3.0R Sigma 4K15 Ultrazentrifuge Optima™ MAX-XP Vakuumzentrifuge Savant Speed Vac DNA 110 | Eppendorf, Hamburg, Deutschland Heraeus, Hanau, Deutschland Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA Beckman Coulter Inc., Fullerton, USA GMI, Ramsey, USA |

3 Methoden

3.1 Mikrobiologische Methoden

3.1.1 Kultivierung von *E. coli*

Escherichia coli wurde aus Glycerinkulturen (siehe Kapitel 3.1.3) auf LB-Agarplatten ausplattiert und für 60 Stunden bei 37 °C inkubiert. Für Expressionsexperimente wurde *E. coli* zweimal auf LB-Agarplatten passagiert, die bei Bedarf Antibiotika enthielten, und jeweils für 24 Stunden inkubiert. Die Anzucht von Flüssigkulturen fand analog dazu in LB-Medium statt.

3.1.2 Kultivierung von *H. pylori*

Helicobacter pylori wurde aus Glycerinkulturen (siehe Kapitel 3.1.3) auf Serumplatten ausplattiert und für 60 Stunden bei 37 °C unter mikroaeroben Bedingungen (5 % O₂, 10 % CO₂, 85 % N₂) inkubiert. Für Expressionsexperimente wurde *H. pylori* zweimal auf Serumplatten passagiert, die bei Bedarf Antibiotika enthielten, und jeweils für 24 Stunden inkubiert.

Zur Anzucht einer Flüssigkultur wurde Brucella-Medium, supplementiert mit 10 % FCS, mit *H. pylori* in einer OD₅₅₀ von 0,1 angeimpft. Diese wurde dann im Rundschüttler (80 rpm) und im Anaerobiertopf unter mikroaeroben Bedingungen kultiviert.

3.1.3 Stammhaltung von Bakterien

Zur Konservierung von Bakterienstämmen wurden Glycerinkulturen angelegt. Dazu wurde das Bakterienmaterial einer halben Agarplatte, nach ca. 18 Stunden Inkubation im Brutschrank, in 800 µl Einfriermedium suspendiert und bei -70 °C gelagert. Das Einfriermedium für *H. pylori* bestand aus 70 % BB, 20 % Glycerin und 10 % FCS, für *E. coli* enthielt es 80 % LB und 20 % Glycerin.

3.1.4 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

Zur Herstellung chemisch kompetenter Rubidium-Chlorid Zellen wurden 200 ml LB-Medium mit 20 ml einer Übernachtskultur *E. coli* versetzt. Die Bakteriensuspension wurde bis zum Erreichen einer OD₅₅₀ von 0,56 bei 37 °C inkubiert. Nach zehnminütiger Zentrifugation (3000 g, 4 °C) wurde der Überstand verworfen, 80 ml gekühltes TfbI zugefügt und die Bakterienzellen für fünf Minuten auf Eis inkubiert. Nach erneuter zehnminütiger Zentrifugation (3000 g, 4 °C) wurde der Überstand verworfen und das Bakterienpellet in 8 ml gekühltem TfbII resuspendiert. Die chemisch kompetenten Bakterien wurden umgehend in 50 µl Aliquots transferiert, schockgefroren und für spätere Experimente bei -70 °C gelagert.

3.1.5 Transformation chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

Zur Transformation von *E. coli*-Zellen wurden 50 µl chemisch kompetenter Zellen sanft auf Eis aufgetaut, 5 µl Ligationsansatz (siehe Kapitel 3.3.7) bzw. Plasmid-DNA (siehe Kapitel 3.3.2) zugegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen einem Hitzeschock (90 s bei 42 °C) unterzogen und direkt im Anschluss wieder für zwei bis drei Minuten auf Eis inkubiert. Nachdem der Transformationsansatz mit 1 ml LB-Medium versetzt wurde, wurde dieser, zur Ausbildung der Antibiotikaresistenz, für 1 h bei 37 °C im Schüttelinkubator inkubiert (1300 rpm). Die Bakteriensuspension wurde zentrifugiert (5 min bei 2500 g), der Überstand dekantiert, das Zell-Pellet im verbliebenen Medium resuspendiert und vorsichtig auf vorgewärmten LB-Selektivplatten ausplattiert. Diese wurden anschließend für 24 h bei 37 °C inkubiert.

3.1.6 Transformation von *H. pylori*

H. pylori ist gekennzeichnet durch eine natürliche Transformationskompetenz. Zur Aufnahme exogener Plasmid-DNA wurde *H. pylori* mit einem sterilen Wattestäbchen von Serumplatten abgestrichen und in BB, supplementiert mit 10 % FCS, resuspendiert. Die Bakterienzellen wurden mit einer OD₅₅₀ von 0,2 und einem Volumen von 1 ml je Transformationsansatz in einer 24-Well Assay-Mikrotiterplatten für ein bis zwei Stunden bei 37 °C und 10 % CO₂ inkubiert. Daraufhin wurden je Well 5 µl isolierter Plasmid-DNA zugefügt (siehe Kapitel 3.3.2) und der Transformationsansatz für erneute vier Stunden bei 37 °C und 10 % CO₂ inkubiert. Die Transformanten wurden auf

antibiotikahaltigen Serumplatten ausplattiert und bei 37 °C unter mikroaeroben Bedingungen (5 % O₂, 10 % CO₂, 85 % N₂). Nach weiteren drei bis fünf Tagen hatten sich Einzelkolonien gebildet.

3.1.7 Bestimmung der optischen Dichte von Bakterien

Die Bestimmung der Zelldichte von Bakterienkulturen geschah durch Extinktionsmessung mit Hilfe eines Spektrophotometers bei einer Wellenlänge von 550 nm (OD₅₅₀). Die Bakterien wurden dazu mit einem sterilen Wattestäbchen von Agarplatten abgenommen und anschließend in BB, LB oder PBS resuspendiert oder stammten direkt aus Flüssigkulturen.

3.2 Zellkultur

3.2.1 Kultivierung von AGS-Zellen

AGS-Zellen wurden in RPMI-Medium 1640, supplementiert mit 10 % FCS, kultiviert. Die Zellen wurden in 75 cm² Zellkulturflaschen bei 37 °C unter 5 % CO₂ in H₂O-gesättigter Atmosphäre kultiviert und vor Bildung eines konfluenten Zellrasens verdünnt. Dazu wurde einmal mit 5 ml PBS gewaschen und die Zellen zum Ablösen vom Flaschenboden mit Trypsin-EDTA-Lösung für vier bis fünf Minuten bei 37 °C inkubiert. Das Ablösen der Zellen wurde mikroskopisch kontrolliert. Durch Zugabe von 5 ml RPMI-Medium 1640, supplementiert mit 10 % FCS, wurde die Trypsin-EDTA-Lösung inaktiviert. Anschließend wurde ein Teil der Zellen in eine neue Zellkulturflasche mit Medium überführt.

3.2.2 Stammhaltung von AGS-Zellen

Zur Lagerung wurden AGS-Zellen einer konfluent bewachsenen 75 cm² Zellkulturflasche durch Zentrifugation gesammelt und in Kryoröhrchen mit Einfriermedium (50 % RPMI-Medium 1640, 45 % FCS, 5 % DMSO) resuspendiert. Das Einfrieren erfolgte erst für 24 h bei -70 °C, anschließend die dauerhafte Lagerung in flüssigem Stickstoff. Zum Auftauen wurden die gefrorenen AGS-Zellen bei 37 °C inkubiert, zweimal mit vorgewärmten RPMI-Medium 1640, supplementiert mit 10 %

FCS, gewaschen (250 g für zehn Minuten) und anschließend in einer 75 cm² Zellkulturflasche bei 37 °C unter 5 % CO₂ in H₂O-gesättigter Atmosphäre kultiviert.

3.2.3 In vitro Infektion von AGS-Zellen

Um den Infektionsprozess eukaryotischer Zellen mit *H. pylori* nachzuahmen wurden *in vitro* Infektionsexperimente durchgeführt. Dafür wurden AGS-Zellen bei ungefähr 80 % Konfluenz in 6-Well-Platten infiziert. Die Bakterien wurden mit einem sterilen Wattestäbchen von Agarplatten abgenommen, in PBS supplementiert mit 10 % FCS resuspendiert und zum Optimieren der Beweglichkeit in einer Vorkultur mit einer OD₅₅₀ von 0,1 für zwei Stunden unter mikroaeroben Bedingungen (siehe Kapitel 3.1.2) bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Bakteriensuspension mit derselben OD wie zuvor in den Überstand der AGS-Zellen zugegeben und die Infektion für weitere vier Stunden unter mikroaeroben Bedingungen bei 37 °C inkubiert. Zur Analyse wurde danach, abhängig von der Fragestellung, ein Phosphotyrosin-Assay (siehe Kapitel 3.4.7), ELISA (siehe Kapitel 3.4.8), Immunfluoreszenz (siehe Kapitel 3.5.3) oder ein TEM1-CagA-Translokations-Assay (siehe Kapitel 3.4.9) durchgeführt.

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 Isolierung genomischer DNA von *H. pylori*

Zur Isolierung genomischer DNA aus *H. pylori* wurde das QIAmp DNA Mini Kit (Qiagen) entsprechend der Angaben des Herstellers verwendet. Dafür wurden die Bakterien mit einem sterilen Wattestäbchen von Serumplatten abgestrichen und in 180 µl ATL-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 20 µl Proteinase K wurde das Reaktionsgefäß unter ständigem Schütteln bei 56 °C für ungefähr drei Stunden inkubiert, bis die Bakterienzellen lysiert und die Suspension komplett klar erschien. Dann wurde zum Ausfällen der Nukleinsäuren 200 µl AL-Puffer zugegeben und für zehn Minuten bei 70 °C inkubiert. Abschließend wurden zusätzlich 200 µl Ethanol in das Reaktionsgefäß zugegeben und die gesamte Probe auf die mitgelieferte Säule geladen um die DNA zu isolieren. Nach einigen Waschschritten wurde die DNA mit ddH₂O von der Säule eluiert und für spätere Experimente bei -20 °C gelagert.

3.3.2 Plasmid-Isolation von *E. coli*

3.3.2.1 Koch Methode

Die Bakterien wurden mit Hilfe einer abgeflamten Impföse von der Agarplatte gesammelt und in 300 µl STET-Puffer resuspendiert. Um die Bakterienzellen zu lysieren und somit die DNA freizusetzen wurden 15 µl Lysozym (10 mg/ml in STET-Puffer) zugegeben, die Suspension zunächst für fünf Minuten auf Eis inkubiert und anschließend für 60 Sekunden bei 100 °C aufgeköcht. Das Lysat wurde bei Raumtemperatur für 15 Minuten und 13000 rpm zentrifugiert und der Überstand, versetzt mit 200 µl Isopropanol, für zehn Minuten bei -20 °C inkubiert, sodass die Plasmid-DNA ausfällt. Diese wurde durch eine zehnminütige Zentrifugation bei 13000 rpm als Pellet gesammelt, welches mit Ethanol (70 %) gewaschen, mit Hilfe der Speed Vac unter Vakuum getrocknet und abschließend in 50 µl ddH₂O resuspendiert wurde.

3.3.2.2 QIA Prep Spin Miniprep Kit

Wenn eine Sequenzierung von Plasmid-DNA durchgeführt wurde, wurde zur DNA-Isolation das QIA Prep Spin Miniprep Kit (Qiagen) entsprechend der Angaben des Herstellers verwendet. Nachdem die Bakterienzellen lysiert und die Plasmid-DNA ausgefällt wurde, wurde diese in 50 µl ddH₂O resuspendiert.

3.3.3 Polymerase Kettenreaktion

Zur spezifischen Amplifikation von DNA-Fragmenten wurde die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) durchgeführt. Dazu wurde eine geringe Menge Ausgangs-DNA (*template*) eingesetzt, an deren DNA-Einzelstränge sich nach Hitzedenaturierung zwei komplementäre Oligonukleotidprimer anlagern konnten (*annealing*), sodass sie den zu amplifizierenden Bereich flankierten. Die Verlängerung (*elongation*) der im Überschuss zugegebenen Oligonukleotidprimer entlang der denaturierten *template*-DNA fand mit Hilfe einer thermostabilen DNA-Polymerase und Desoxyribonukleotidtriphosphaten (dNTPs) statt. Um eine erneute Anlagerung der Oligonukleotidprimer nach der Elongation zu ermöglichen, wurde der neu entstandene DNA-Doppelstrang zu Beginn jedes Zyklus wieder in zwei Einzelstränge denaturiert. Dadurch wurde eine

exponentielle Amplifikation der *template*-DNA erreicht. Der Erfolg der PCR wurde anschließend mittels Agarosegel-Elektrophorese (siehe Kapitel 3.3.4) überprüft und das PCR-Produkt bei 4 °C gelagert.

PCR-Mix zur Verwendung der *ExTaq* Polymerase:

- 1 µl Template-DNA
- 1 µl 3'-Oligonucleotidprimer
- 1 µl 5'-Oligonucleotidprimer
- 5 µl 10x *ExTaq*-Puffer
- 5 µl Magnesiumchlorid (MgCl₂, 25 mM)
- 4 µl dNTPs (2,5 mM)
- 22,8 µl ddH₂O
- 0,2 µl *ExTaq*-Polymerase

| Schritt | Temperatur | Zeit | Wiederholungen |
|-----------------------|------------|---------------|----------------|
| Primäre Denaturierung | 95 °C | 5 min | 1x |
| Denaturierung | 95 °C | 30 s | 30x |
| Annealing | 52 °C | 30 s | |
| Elongation | 68 °C | 1 min/1000 bp | |
| Finale Elongation | 68 °C | 10 min | 1x |

3.3.4 Agarosegel-Elektrophorese

Zur analytischen Auftrennung von DNA-Proben entsprechend ihres Molekulargewichts nach vorangegangener PCR (siehe Kapitel 3.3.3) bzw. zur präparativen Auftrennung nach Restriktionsverdau (siehe Kapitel 3.3.6) wurde eine Agarosegel-Elektrophorese durchgeführt. Hierbei durchwanderten die DNA-Fragmente für 50 bis 90 Minuten ein mit TAE-Puffer bedecktes 1 %iges Agarose-Gel bei einer applizierten Spannung von 70 mV. Das aufgetragene Probenvolumen betrug 8 µl. Das Agarose-Gel wurde anschließend in einem Ethidiumbromid-Bad für ungefähr zehn Minuten angefärbt. Die Analyse und Bildgebung der gefärbten DNA-Fragmente erfolgte mit dem Geldokumentationssystem ChemiDoc™ MP Imaging System (BioRad).

Probenzusammensetzung:

3 µl DNA-Probe

5 µl GEBS

3.3.5 Aufreinigen von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente, die durch einen Verdau mit Restriktionsendonukleasen (siehe Kapitel 3.3.6) oder Agarosegel-Elektrophorese (siehe Kapitel 3.3.4) gewonnen wurden, wurden vor jeglicher Weiterverarbeitung einem Reinigungsschritt unterzogen um etwaige Verunreinigungen der DNA-Probe zu beseitigen. Dafür wurde das illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE-Healthcare) entsprechend der Angaben des Herstellers verwendet.

3.3.6 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Analytische DNA-Verdaue erfolgten mit Restriktionsenzymen von Thermo Fisher Scientific oder Roche Applied Science sowie den entsprechenden Puffersystemen in einem Gesamtvolumen von 10 µl. Nach Inkubation des Verdauansatzes für eine Stunde bei 37 °C wurden die entstandenen DNA-Fragmente mittels Agarosegel-Elektrophorese analysiert.

Verdauansatz für analytische Restriktion:

1 µl 10x Puffer

4 µl ddH₂O

0,5 µl je Restriktionsendonuklease

4 µl Proben-DNA

Zum Nachschneiden von PCR-Fragmenten vor Ligation (siehe Kapitel 3.3.7) wurde das komplette PCR-Produkt zuerst aufgereinigt (siehe Kapitel 3.3.5), dann für drei Stunden mit den passenden Restriktionsendonukleasen bei 37 °C inkubiert und schließlich einem weiteren Reinigungsschritt unterzogen.

Präparative Restriktionen wurden in einem Volumen von ca. 50 µl durchgeführt. Nach Inkubation der DNA-Probe für drei Stunden bei 37 °C wurden die entstandenen DNA-Fragmente mittels Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt (siehe Kapitel 3.3.4) und vor der sich anschließenden Ligation aufgereinigt (siehe Kapitel 3.3.5).

Verdauansatz für PCR-Fragmente und präparative Restriktion:

- 5 µl 10x Puffer
- 1,5 µl je Restriktionsendonuklease
- 45 µl Vektor-DNA/aufgereinigtes PCR-Fragment

3.3.7 Ligation

Für Ligationen wurden der geschnittene und aufgereinigte Vektor sowie das zu inserierende DNA-Fragment (siehe Kapitel 3.3.5, 3.3.6), Ligase-Puffer und eine DNA-Ligase eingesetzt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4 °C. Für die Transformation in *E. coli* (siehe Kapitel 3.1.5) wurden 5 µl des Ligationsansatzes verwendet und die übrigen 5 µl für maximal 48 Stunden bei 4 °C gelagert.

Ligationsansatz:

- 1 µl Vektor-DNA
- 7 µl PCR-Produkt
- 1 µl 10x Ligase-Puffer
- 1 µl T4-DNA-Ligase

3.3.8 DNA Sequenzierung und Sequenzanalyse

DNA-Sequenzierungen wurden von der Firma GATC Biotech AG (Konstanz, Deutschland) durchgeführt. Dafür wurden 5 µl der DNA-Probe mit 5 pmol/ml Primer versetzt. Die eingesetzten Sequenzierprimer waren Standardprimer oder selbstgewählte Oligonukleotide. Die Analyse der DNA-Sequenzen wurde mit Hilfe der Computer-Software CLC DNA Workbench 6 (Qiagen) durchgeführt.

3.4 Proteinbiochemie/Proteomics

3.4.1 Herstellung bakterieller Zelllysate

Zur Herstellung von Lysaten wurden Bakterien mit einem sterilen Wattestäbchen von Agarplatten abgenommen, in PBS suspendiert und auf eine OD₅₅₀ von zehn eingestellt. Nach Zentrifugation der Bakteriensuspension für fünf Minuten bei 4000 g wurde der Überstand verworfen, das Bakterienpellet in entsprechendem Volumen PBS resuspendiert und mit 2x SDS-Probenpuffer und 5 % des Gesamtvolumens Mercaptoethanol versetzt. Die bakteriellen Zelllysate wurden vor dem Auftragen auf ein Polyacrylamid-Gel zuerst für zehn Minuten bei 95 °C aufgeköcht und anschließend für zwei Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert.

3.4.2 Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinlysaten entsprechend ihres Molekulargewichts geschah mit Hilfe einer Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE). Hierbei durchwanderten die Proteine zuerst ein Polyacrylamid-Sammel-Gel bei einer applizierten Spannung von 100 Volt und anschließend das darunter geschichtete Trenn-Gel. Sobald die Proteinproben das Sammel-Gel verlassen hatten wurde die Spannung auf 130 Volt erhöht. Je nach Molekulargewicht der aufzutrennenden Proteine wurden 8 % bis 12 %ige Trenn-Gele eingesetzt. Das aufgetragene Probenvolumen betrug 10 µl. Die aufgetrennten Proteinlysate wurden anschließend entweder auf eine PVDF-Membran übertragen und durch Immunoblot analysiert (siehe Kapitel 3.4.4) oder mit einer Coomassie Brilliant Blue-Lösung angefärbt (siehe Kapitel 3.4.3).

| | |
|----------------------|--|
| Elektrophoresepuffer | 250 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS, 25 mM Tris-HCl, pH 8,3 |
|----------------------|--|

SDS-Polyacrylamidgel Zusammensetzung für 1 Gel:

| | Trenn-Gel | | | Sammel-Gel |
|---------------------------------------|-----------|--------|--------|------------|
| | 8 % | 10 % | 12 % | |
| ddH ₂ O | 2,3 ml | 1,9 ml | 1,6 ml | 0,68 ml |
| (Bis-) Acrylamid (Rotiphorese®Gel 30) | 1,3 ml | 1,7 ml | 2,0 ml | 0,17 ml |

| | | | | |
|----------------------------------|--------|--------|--------|---------|
| 1,5 M Tris/HCl, pH 8,8 | 1,3 ml | 1,3 ml | 1,3 ml | - |
| 1,0 M Tris/HCl, pH 6,8 | | | | 0,13 ml |
| 10 % (w/v) SDS | | | | 10 µl |
| 10 % (w/v) Ammoniumperoxidsulfat | | | | 10 µl |
| Tetramethylethyldiamin (TEMED) | 3 µl | 2 µl | 2 µl | 1 µl |

3.4.3 Coomassie Brilliant Blue-Färbung

SDS-Gele (siehe Kapitel 3.4.2) wurden zuerst für 0,5 bis zwei Stunden unter ständiger Bewegung in Coomassie-Färbelösung angefärbt und anschließend für bis zu 48 Stunden sanft in Entfärbelösung geschüttelt, bis die Proteinbanden deutlich sichtbar waren.

| | |
|--------------------------|---|
| Coomassie-Färbelösung | 0,1 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R 250 in 10 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Ethanol, 7,5 % Essigsäure |
| Coomassie-Entfärbelösung | 10 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Ethanol, 7,5 % (v/v) Essigsäure |

3.4.4 Immunoblot (*Western Blot*)

3.4.4.1 Transfer von Proteinen auf PVDF-Membran

Die über Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese aufgetrennten Proteinlysate wurden mittels einer *Semi-Dry-Blotting* Kammer (Biotec-Fischer) und eines elektrischen Feldes aus dem Gel eluiert und auf eine PVDF (Polyvinylidendifluorid)-Membran transferiert. Auf der Anode wurde ein Stapel aus zwei dicken Filterpapieren, getränkt in Anode I-Puffer, und zwei dünnen Filterpapieren, getränkt in Anode II-Puffer, gebildet. Auf den Stapel wurden dann eine PVDF-Membran, die zuerst kurz in Methanol und dann in Kathode-Puffer quellen gelassen wurde, und das SDS-PAGE-Gel transferiert, gefolgt von wiederum zwei dünnen und zwei dicken Filterpapieren, jeweils getränkt in Kathode-Puffer. Für den Transfer der Proteine vom Gel auf die PVDF-Membran wurde eine Stromstärke von 1,25 mA/cm² für 70 Minuten appliziert.

| | |
|-----------------|---|
| Anode I-Puffer | 300 mM Tris-HCl, pH 10,4 10 % Methanol |
| Anode II-Puffer | 25 mM Tris-HCl, pH 10,4 10 % Methanol |
| Kathode-Puffer | 25 mM Tris-HCl, pH 9,6 40 mM 6-Aminocapronsäure 10 % Methanol |

3.4.4.2 Immundetektion immobilisierter Proteine

Nach dem Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran wurden freie Bindungsstellen auf der Membran für eine Stunde mit einer Blockierungslösung gesättigt. Danach wurde die Membran mit dem ersten Antikörper (siehe Kapitel 2.9), verdünnt in TBST/1 % Milchpulver, für zwei Stunden auf dem Rollmischer inkubiert. Nach drei jeweils fünfminütigen Waschschritten, um unspezifisch gebundene Antikörper wieder zu entfernen, wurde ein Zweitantikörper (konjugiert mit AP, siehe Kapitel 2.9), ebenfalls verdünnt in TBST/1 % Milchpulver zugefügt und die Membran für eine Stunde auf dem Rollmischer inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit Waschlösung wurde die Membran durch Schwenken in 10 ml Detektionslösung entwickelt bis die Proteinbanden sichtbar waren. Die Farbreaktion wurde anschließend durch Zugabe von Leitungswasser abgestoppt.

| | |
|--------------------|--|
| Blockierungslösung | TBST/5 % Milchpulver |
| Waschlösung | 1x TBST |
| Detektionslösung | 0,1 M Tris-HCl, pH 9,6 7 mM MgCl ₂ 0,1 g/l Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT) 50 mg/l 5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat (BCIP) |

3.4.5 Labeling von Q-Tag-Proteinen mit FITC-Cadaverin

Nach einer im Jahr 2006 publizierten Methode können auf der Zelloberfläche exponierte Proteine, an die im Voraus ein sogenannter Q-Tag fusioniert wurde, durch das Enzym Transglutaminase mit dem biogenen Amin Cadaverin ligiert werden. Der Q-Tag ist ein aus sechs Aminosäuren aufgebautes Peptid, darunter dreimal hintereinander die Aminosäure Glutamin (GQQQLG). Glutamin dient als Substrat für das Enzym Transglutaminase, welches daraufhin die Q-Tag-Seitenkette an Cadaverin ligiert. Cadaverin wiederum wurde im Voraus an einen fluoreszierenden Farbstoff fusioniert, dessen emittiertes Signal dann nach erfolgreicher Ligation visualisiert werden kann (Lin & Ting, 2006).

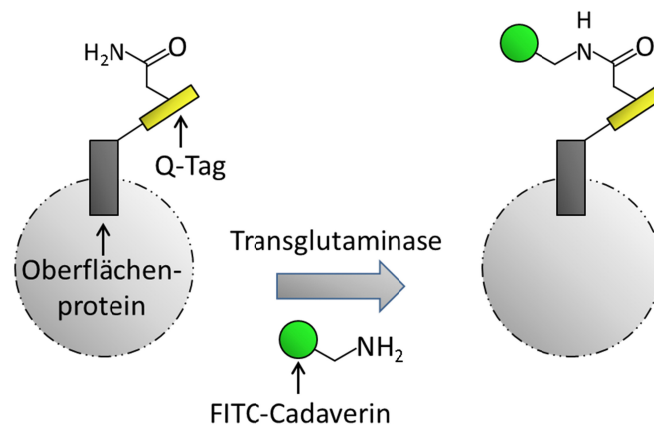


Abbildung 3.4.1: Labeling von Proteinen mit fusioniertem Q-Tag

Ligation der Seitenkette des Q-Tags (gelb) mit FITC-Cadaverin (grün) durch das Enzym Transglutaminase (modifiziert nach Lin & Ting, 2006).

Ziel unseres Versuchsaufbaus war es Proteine mit zuvor fusioniertem Q-Tag durch an Cadaverin gekoppeltes Fluorescein-5-isothiocyanate (FITC) zu markieren. Die zu untersuchenden *H. pylori*-Mutanten wurden auf Serumplatten angezogen und mit einer OD₅₅₀ von 40 in Probenpuffer resuspendiert. Die Bakterien-Lysate wurden anschließend auf Eis transferiert und durch Ultraschall aufgeschlossen (duty cycle 75, output control 8, Sonifier™ 450, Branson Ultrasonics™). Die Abtrennung ganzer Zellen erfolgte durch Zentrifugation (fünf Minuten bei 4000 rpm, 4 °C). Der Überstand betrug 200 µl. Diesem wurden 2 µl FITC-Cadaverin (0,5 mM) und 5 µl gp-Transglutaminase

(25 ng/μl) zugefügt und für zwei Stunden bei RT im Dunkeln inkubiert. Daraufhin wurden die Proben zuerst einer Proteinfällung unterzogen (siehe Kapitel 3.4.6) und dann über SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (siehe Kapitel 3.4.2) aufgetrennt. Die Analyse und Bildgebung der SDS-PAGE erfolgte mit dem Geldokumentationssystem ChemiDoc™ MP Imaging System (BioRad). Zur Markierung ganzer Bakterienzellen wurden die *H. pylori*-Mutanten analog zu obigem Vorgehen in Probenpuffer resuspendiert, in 200 μl Aliquots überführt und direkt anschließend für zwei Stunden mit 2 μl FITC-Cadaverin (0,5 mM) und 5 μl gpTG (25 ng/μl) bei RT im Dunkeln inkubiert. Die Analyse und Bildgebung der *H. pylori*-Mutanten erfolgte unter dem Fluoreszenzmikroskop (siehe Kapitel 3.6).

| | |
|--------------|---|
| Probenpuffer | 20 mM HEPES, pH 8,2 10 mM MgCl ₂ 0,1 mM EGTA 5 mM CaCl ₂ |
|--------------|---|

3.4.6 Proteinfällung

Zum Anreichern von Proteinen wurde die Proteinfällung nach Wessel und Flügge durchgeführt. 300 μl der Proteinlösung wurden mit 600 μl Methanol versetzt und kurz gevortext und anschließend 200 μl Chloroform und 200 μl ddH₂O zugefügt und für zwei Minuten geschüttelt. Nach fünfminütiger Zentrifugation bei 4000 rpm wurde der Überstand verworfen (Methanol-H₂O-Phase), 1 ml Methanol zugefügt, erneut für zwei Minuten geschüttelt und fünf Minuten bei 4000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in einer Vakuumzentrifuge getrocknet und anschließend in 20 μl 1x SDS-Probenpuffer aufgenommen. Die Proteinlysate wurden für zehn Minuten bei 95 °C aufgekocht, für zwei Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert und anschließend auf einem Polyacrylamid-Gel aufgetragen.

3.4.7 Phosphotyrosin-Assay

H. pylori ist beim Infektionsprozess eukaryotischer Zellen in der Lage in diese das CagA-Protein zu translozieren. Dieses Effektorprotein wird daraufhin in der Wirtszelle

phosphoryliert. Dieser Mechanismus wurde genutzt um die Translokationseffizienz von CagA in die Wirtszelle zu analysieren. Hierfür wurden AGS-Zellen nach dem Standardprotokoll mit *H. pylori* infiziert (siehe Kapitel 3.2.3) und dann auf Eis abgekühlt. Devitale und nicht adhärente AGS-Zellen wurden durch zweimaliges Waschen mit PBS* entfernt. Anschließend wurden adhärente Zellen in 1 ml PBS* mit Hilfe eines Zellschabers abgelöst, durch Zentrifugation sedimentiert und in 2x SDS-Probenpuffer für eine Polyacrylamidgel-Elektrophorese resuspendiert (siehe Kapitel 3.4.1, 3.4.2). Phosphoryliertes CagA-Protein wurde anschließend mittels Immunoblot (siehe Kapitel 3.4.4) mit spezifischen Antikörpern dargestellt (siehe Kapitel 2.9).

3.4.8 ELISA

Bei einer Infektion mit *H. pylori* geben AGS-Zellen den Entzündungsmediator Interleukin-8 (IL-8) in ihre Umgebung ab. Hierdurch sollen Leukozyten in das entzündete Gewebe rekrutiert werden. Durch ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) kann die Menge an IL-8, die bei *in vitro* Infektionsexperimenten von AGS-Zellen in den Überstand sezerniert wird, quantifiziert werden. Hierfür wurde eine durchsichtige 96-Well Mikrotiterplatte (Nunc™ MicroWell™) mit 100 µl des sogenannten „Fangantikörper“, hier α -IL-8 verdünnt in Beschichtungspuffer, beschichtet und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Wells dreimal mit Waschpuffer gewaschen und danach mit 200 µl Blockierungspuffer gesättigt und für zwei bis vier Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Wells erneut dreimal gewaschen und je 100 µl des zu analysierenden Überstandes von AGS-Zellen aus *in vitro* Infektionsexperimenten (siehe Kapitel 3.2.3) (verdünnt in RPMI/10 % FCS) zugegeben. Um eine quantitative Bestimmung der IL-8 Konzentration in den Zellkulturüberständen zu ermöglichen, wurde in der 96-Well Mikrotiterplatte ebenfalls eine Verdünnungsreihe von humanem IL-8 (BD OptEIA™, BD Biosciences) mit bekannten Konzentrationen angelegt. Die IL-8 Konzentrationen reichten hierbei von 0 bis 800 µg/ml. Die Mikrotiterplatte wurde über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde sie viermal mit Waschpuffer gewaschen um ungebundenes IL-8 zu entfernen und danach je Well 100 µl biotinylierter α -IL-8

Antikörper zugegeben (0,5 µg/ml in Blockierungspuffer). Nach zweistündiger Inkubation bei Raumtemperatur und vier weiteren Waschschritten wurden je Well 100 µl einer Streptavidin-Biotin-POX-Lösung zugegeben (Biozol) und für eine weitere Stunde inkubiert. Anschließend wurde die Mikrotiterplatte sechsmal mit Waschpuffer gewaschen und je Well 100 µl einer Tetramethylbenzidin-Lösung (TMB Substrate Reagent Set, BD OptEIA™, BD Biosciences) zugegeben und für 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Durch Zugabe von 50 µl 1 M Schwefelsäure (H₂SO₄) je Well wurde das zuvor blaue TMB gelb gefärbt und die optische Dichte der Proben konnte bei einer OD₄₅₀ bestimmt werden (CLARIOstar®, BMG Labtech). Durch Verrechnung mit der Standard-Verdünnungsreihe von humanem IL-8 mit bekannten Konzentrationen konnten die daraus resultierenden IL-8-Mengen je Probe quantifiziert werden.

| | |
|--------------------------------|--|
| Beschichtungspuffer | 3 µg/ml α-IL-8 in 100 mM Na ₂ HPO ₄ , pH 9,0 |
| Waschpuffer | PBS substituiert mit 0,05 % Tween-20 |
| Blockierungspuffer | PBS substituiert mit 0,05 % Tween-20 und 10 % FCS |
| Streptavidin-Biotin-POX-Lösung | <i>für eine 96-Well Mikrotiterplatte:</i> 1,5 µl Lösung A 1,5 µl Lösung B in 10 ml 50 mM Tris-HCl, pH 7,6 |

3.4.9 TEM-1-CagA-Translokations-Assay

Der TEM-1-CagA-Translokations-Assay ist eine neuartige Methode zur Quantifizierung der Translokation des Effektorproteins CagA in die eukaryotische Zelle. Es basiert auf der Fusion des Effektorproteins mit der β-Laktamase TEM-1. Nach Sekretion des Fusionsproteins TEM-1-CagA in die eukaryotische Zielzelle wird das fluoreszierende β-Laktamase-Substrat CCF4-AM zugegeben. Die Spaltung dieses Substrats durch die β-Laktamase inhibiert dessen *fluorescence resonance energy transfer* (FRET), was zu einem veränderten Fluoreszenzsignal führt, von grün zu blau, und somit eine quantitative Auswertung ermöglicht (Schindele et al., 2016).

Dafür wurden AGS-Zellen ausschließlich mit *H. pylori*-Mutanten infiziert, die ein TEM-1-CagA Fusionsprotein produzierten (siehe Kapitel 2.1.2). Die AGS-Zellen wurden für zweieinhalb Stunden mit einer Bakterien-OD₅₅₀ von 0,1 in einer schwarzen 96-Well Platte mit durchsichtigem Boden (96-Well Costar® Zellkulturplatten, Corning Inc.) unter Standardbedingungen infiziert (siehe Kapitel 3.2.3). Anschließend wurden die Zellen mit dem an einen fluoreszierenden Farbstoff gekoppelten Substrat CCF4-AM, ein Cephalosporin, verdünnt in der dazugehörigen Ladelösung (LiveBLAzer™-FRET B/G Loading Kit, Invitrogen) beladen und für zwei Stunden bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die Messung der Fluoreszenz-Intensität wurde mit einem Plattenlesegerät (CLARIOstar®, BMG Labtech) bei einer Anregungswellenlänge von 405 nm (10 nm Bandbreite) durchgeführt. Die Lichtemission wurde bei 460 nm (20 nm Bandbreite, blaue Fluoreszenz) und bei 530 nm (15 nm Bandbreite, grüne Fluoreszenz) detektiert. Als Quantifizierung der Translokation von CagA wurde das Blau-zu-Grün-Verhältnis definiert, also der Absolutwert der Lichtemission bei 460 nm_(Probe-Leerwert), geteilt durch Absolutwert bei 530 nm_(Probe-Leerwert). Als Leerwert wurden Wells genutzt die ausschließlich mit CCF4-AM und der dazugehörigen Ladelösung beladen wurden, jedoch nicht mit AGS-Zellen oder Bakterien. Um die relative CagA-Translokations-Effizienz zu bestimmen wurden zusätzlich die AGS-Zellen eines Wells mit einer Positivkontrolle, P12[TEM-CagA], und eines weiteren Wells mit einer Negativkontrolle, P12[TEM-CagA]ΔcagT, infiziert. Die relative CagA-Translokation einer *H. pylori*-Mutante wurde wie folgt berechnet:

$$\frac{(\text{Blau-zu-Grün-Verhältnis}_{\text{(Probe-Negativkontrolle)}})}{(\text{Blau-zu-Grün-Verhältnis}_{\text{(Positivkontrolle-Negativkontrolle)}})} * 100$$

| | |
|--------------|---|
| Beladelösung | <i>für 20 Wells (1 ml):</i> 1 µl Lösung A (1mM CCF4-AM) 10 µl Lösung B 156 µl Lösung C 5 µl Probenecid (200 mM, Sigma-Aldrich, USA) 828 µl PBS |
|--------------|---|

3.4.10 Zellfraktionierung durch Ultrazentrifugation

Um Membran- und Plasmaphasen von *H. pylori* voneinander zu separieren wurden Zellfraktionierungen durch Ultrazentrifugation durchgeführt. Die zu untersuchenden *H. pylori*-Mutanten mit fusionierten Molekular-*Tags* wurden auf Serumplatten angezogen und mit einer OD₅₅₀ von 30 in TBS*-Puffer resuspendiert. Die Bakterien-Lysate wurden anschließend auf Eis gelagert und durch Ultraschall aufgeschlossen (duty cycle 75, output control 8, Sonifier™ 450, Branson Ultrasonics™). Die Abtrennung ganzer Zellen erfolgte durch Zentrifugation (30 Minuten bei 13.000 rpm, 4 °C). Der Überstand wurde in Ultrazentrifugenröhrchen überführt. In der Ultrazentrifuge (60 Minuten bei 100.000 rpm, 450.000 g, 4 °C) wurden die löslichen Bakterienproteine der Plasmaphase (Überstand) von den unlöslichen, membrangebundenen Proteinen (Pellet) abgetrennt. Um die in der Plasmaphase vorliegenden Proteine, und deren Interaktionspartner, zu bestimmen, wurde der Überstand durch *tandem-affinity-purification* (siehe Kapitel 3.5.2) analysiert. Die membrangebundenen Proteine, die zuvor im Pellet gesammelt wurden, wurden, durch Zugabe von RIPA* und Inkubation für eine Stunde auf dem Rollmischer bei 4 °C, extrahiert und ebenfalls in Lösung gebracht. Nicht-extrahierte Membranproteine wurden durch Ultrazentrifugation (60 Minuten bei 100.000 rpm, 450.000 g, 4 °C) abgetrennt und als Pellet gesammelt. Um die ehemals membrangebundenen Proteine und deren Interaktionspartner zu bestimmen, wurde der Überstand der zweiten Ultrazentrifugation ebenfalls durch *tandem-affinity-purification* (siehe Kapitel 3.5.2) analysiert.

| | |
|-----|---------------------------------------|
| TBS | 15 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7,5 |
|-----|---------------------------------------|

3.5 Immunologie

3.5.1 Immunpräzipitation

Um Protein-Protein Interaktionen nachzuweisen wurde die Immunpräzipitation eingesetzt. Indem dem Protein-Lysat Antikörper zugegeben wurden, die spezifisch mit Molekular-*Tags* interagierten, welche zuvor an die zu untersuchenden *H. pylori*-Proteine fusioniert wurden, konnten diese Proteine mitsamt ihrer Interaktionspartner aus dem Protein-Lysat abgetrennt werden. Dies erfolgte mit Hilfe von an Agarosekugeln gekoppeltem Protein G, welches mit hoher Spezifität an die F_C-Region von Immunglobulinen bindet. Die zu untersuchenden *H. pylori*-Mutanten mit fusionierten Molekular-*Tags* wurden auf Serumplatten angezogen und mit einer OD₅₅₀ von 30 in RIPA*-Puffer resuspendiert. Die Bakterien-Lysate wurden anschließend auf Eis gelagert und durch Ultraschall aufgeschlossen (duty cycle 75, output control 8, Sonifier™ 450, Branson Ultrasonics™). Die Abtrennung ganzer Zellen erfolgte durch Zentrifugation (zehn Minuten bei 13.000 rpm, 4 °C). Dem Überstand wurde der entsprechende Antikörper zugefügt (αM45 1:10; αHA 1:100) und über Nacht bei 4 °C auf dem Rollmischer inkubiert. Daraufhin wurde den Proben 50 µl Protein G-Agarose zugefügt und für weitere zwei Stunden bei 4 °C auf dem Rollmischer inkubiert. Um unspezifisch an die Agarosekugeln gebundene Proteine zu entfernen, wurden die Proben zuletzt dreimal mit RIPA*-Puffer gewaschen. Die Proteinkomplexe wurden durch Aufkochen in 2xSDS-Probenpuffer (siehe Kapitel 3.4.1) wieder von den Agarosekugeln abgelöst und anschließend durch SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (siehe Kapitel 3.4.2) und Immunoblot (siehe Kapitel 3.4.4) analysiert.

3.5.2 *tandem-affinity-purification*

Zur Reduktion unspezifisch präzipitierender Proteine bei der Immunpräzipitation wurde die *tandem-affinity-purification* eingesetzt. Hierfür wurden *H. pylori*-Mutanten verwendet, die jeweils an zwei separaten Proteinen fusionierte Molekular-*Tags* enthielten (siehe Transformationsschema 4.1.4). Dabei wurde in einem ersten Schritt das gewünschte Protein mitsamt seiner Interaktionspartner mittels des fusionierten Molekular-*Tags* immunpräzipitiert (siehe Kapitel 3.5.1). Anschließend wurde der an die Protein G-Agarose gebundene Proteinkomplex wieder eluiert. Hierfür wurde zum

Proteinlysat Glycin zugegeben (100 mM, pH 2,7) und für 30 Minuten bei 4 °C auf dem Rollmischer inkubiert. Die so gewonnene Suspension wurde mit 1 M Tris-HCl (pH 9,6) wieder auf einen neutralen pH-Wert gebracht und anschließend mittels des fusionierten zweiten Molekular-*Tags* eine weitere Immunpräzipitation durchgeführt. Die Immunpräzipitate wurden anschließend wieder in 2xSDS-Probenpuffer solubilisiert und durch SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (siehe Kapitel 3.4.2) und Immunoblot (siehe Kapitel 3.4.4) analysiert.

3.5.3 Immunfluoreszenz

Um die Lokalisation zweier Proteine in der Bakterienzelle mikroskopisch darzustellen, wurden Doppel-Immunfluoreszenzfärbungen mit Proteinen mit fusionierten *Tags* durchgeführt. Zur Detektion intrazellulärer Proteine wurden die Zellen mit Triton X-100 permeabilisiert. Es wurden die Vertiefungen einer 24-Well Platte mit Deckgläschen versehen und die zu untersuchenden *H. pylori*-Mutanten mit einem sterilen Wattestäbchen von Serumplatten gestrichen und in PBS resuspendiert. In jedes Well wurde 1 ml der Bakteriensuspension mit einer OD₅₅₀ von 0,2 überführt. Zum Immobilisieren der Bakterien auf den Deckgläschen wurde sie zuerst für fünf Minuten bei 3.500 rpm zentrifugiert und anschließend über Nacht mit Paraformaldehyd inkubiert. Nach Fixation der Bakterien auf den Deckgläschen wurden freie Bindungsstellen mit einer Blockierungslösung für fünf Minuten gesättigt. Danach wurden die Deckgläschen mit den Erstantikörpern (siehe Kapitel 2.9), verdünnt in PBS, für eine Stunde in einer lichtgeschützten, feuchten Kammer inkubiert. Nach drei jeweils fünfminütigen Waschschritten mit PBS, um unspezifisch gebundene Antikörper wieder zu entfernen, wurden in gleicher Vorgehensweise die an Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten Zweitantikörper zugegeben. Nach einstündiger Inkubation und den darauffolgenden Waschschritten wurden die fixierten Proben zum Anfärben chromosomaler DNA für 5 Minuten unter den selben Bedingungen wie zuvor mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) inkubiert. Die Deckgläschen wurden einmal erneut mit PBS gewaschen, mit Eindeckmittel auf einem Objektträger fixiert und danach in einer lichtgeschützten Box bei 4 °C aufbewahrt. Die weitere Analyse der Proben erfolgte mit dem Konfokalmikroskop (siehe Kapitel 3.6).

| | |
|---------------------------|---|
| Permeabilisierungs-Lösung | PBS substituiert mit 0,1 % Triton X-100 |
| Blockierungs-Lösung | PBS substituiert mit 0,2 % Rinderserumalbumin (BSA, Sigma-Aldrich, USA) |
| Eindeckmittel | Dako fluorescent mounting medium (Dako North America Inc, Carpinteria, USA) |

3.6 Bildgebung mit dem Konfokal- und Fluoreszenzmikroskop

Die mikroskopische Betrachtung von Bakterien nach Immunfluoreszenzfärbung (siehe Kapitel 3.5.3) erfolgte mit einem konfokalen Laserscanning-Mikroskop (TCS SP 5 II, Leica). Zur mikroskopischen Betrachtung von Bakterien nach Labeling mit FITC-Cadaverin (siehe Kapitel 3.4.5) wurde das Fluoreszenzmikroskop verwendet (DM IRB, Leica). Die Bilder wurden digital gespeichert und mit der Software Fiji (ImageJ) bearbeitet.

3.7 Statistische Auswertung

Alle Werte sind Mittelwerte von mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten $\pm (t_{\text{crit}} * \text{Standardfehler})$. Dabei wurde der Standardfehler berechnet, indem die Standardabweichung durch die Wurzel von (N-1) dividiert wurde. Für t_{crit} wurde ein 95 % Konfidenzintervall berechnet.

4 Ergebnisse

4.1 Visualisierung von CagH und CagL

Die genaue Lokalisation von CagH und CagL in der Zelle sowie die Funktion beider Proteine konnte bisher nicht ausreichend geklärt werden. Es liegen Hinweise vor, dass CagL direkt an der Pilusstruktur beteiligt ist. CagH hingegen scheint eine Kontrollfunktion bei dem korrekten Zusammenbau der Pili einzunehmen (Shaffer et al., 2011). Nachdem elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen konnten, dass das vermutliche VirB5-Ortholog CagL auf der Oberfläche der Bakterienzelle, genauer der Pilus-Spitze, lokalisiert ist und da ebenfalls bekannt ist, dass CagL mit CagH und CagI interagiert, liegt die Vermutung nahe, dass auch diese beiden Proteine auf der Bakterienoberfläche lokalisiert sind (Backert et al., 2008; Kwok et al., 2007; Pham et al., 2012; Shaffer et al., 2011). Um CagH und CagL, für die bisher keine genügend spezifischen Antikörper vorliegen, besser untersuchen zu können, sollten *H. pylori*-Mutanten erzeugt werden, welche die beiden Proteine mitsamt einem fusionierten Epitop-Tag produzieren. Diese sollten anschließend in der Bakterienzelle visualisiert werden. Die kodierenden Sequenzen für die Tags sollten so in die Genabschnitte integriert werden, dass weder Signal-Sequenzen noch Funktion beeinflusst werden. Als erstes wurden die beiden Proteine mit einem sogenannten Q-Tag fusioniert um sie anschließend zu visualisieren. Dieser Tag besteht aus sechs Aminosäuren und verdankt seinen Namen der Aminosäure Glutamin, welche dreimal aufeinanderfolgend in ihm vorkommt (GQQQLG) (Lin & Ting, 2006). Durch das Enzym Transglutaminase kann der Q-Tag mit dem Substrat Cadaverin, welches gekoppelt an den Fluoreszenzfarbstoff FITC vorliegt, ligiert und das dabei emittierte Fluoreszenz-Signal anschließend detektiert werden. Ein Vorteil bei Verwendung des Q-Tags liegt darin, dass dieser sehr klein ist, sodass die Funktion der markierten Proteine nicht gestört werden sollte. Des Weiteren geht die enzymatische Kopplung des Cadaverins an Glutamin durch Transglutaminase auch in vivo von statten, sodass bei diesem Vorgehen ein größerer Informationsgewinn erreicht werden könnte.

4.1.1 Generierung von *H. pylori*-Mutanten mit einem mit CagH fusionierten Q-Tag

Zur Konstruktion des Plasmids pAM1, welches die genetischen Informationen für CagH mit fusioniertem Q-Tag enthält, wurde das Gen *cagH* mit Hilfe des Primerpaares WS638 und WS663 von der *template*-DNA P12 WT amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *NotI* zusammen mit dem Q-Tag-Fragment in den Expressionsvektor pLH2 Δ *babA* ligiert (Abbildung 4.1.1). Das resultierende Plasmid wurde in *E. coli* Top10 transformiert und die Bakterien auf geeigneten Selektionsplatten ausplattiert. Nach Isolierung und Sequenzierung des Plasmids wurde pAM1 anschließend in eine *H. pylori* Δ *cagH*-Mutante transformiert, wo es unter der Kontrolle des *alpA*-Promotors produziert wurde. Zur funktionellen Analyse der generierten Mutanten wurden Ganzzell-Lysate mittels SDS-PAGE und darauffolgendem Immunoblot auf Produktion von CagH und CagA untersucht und Infektionsansätze von AGS-Zellen in Bezug auf phosphoryliertes CagA analysiert (Abbildung 4.1.2 A). Als Positivkontrolle wurde der WT-*H. pylori*-Stamm P12 verwendet, als Negativkontrolle eine *H. pylori* Δ *cagH*-Mutante. Die Ergebnisse zeigen, dass die generierten Mutanten CagH und CagA in einer mit dem Wildtyp vergleichbaren Menge produzieren und, dass CagA bei Infektionsexperimenten mit AGS-Zellen auch Tyrosin-phosphoryliert wird. Durch Untersuchung von AGS-Zellkulturüberständen nach Infektionsexperimenten mit den dargestellten *H. pylori*-Stämmen mittels ELISA konnte gezeigt werden, dass auch die IL-8-Induktion nahezu der des Wildtyps P12 entspricht (Abbildung 4.1.2 B). Die Ergebnisse zeigen, dass die Fusion von CagH mit einem Q-Tag keinen negativen Effekt auf die Funktionalität der generierten Mutanten ausübt.

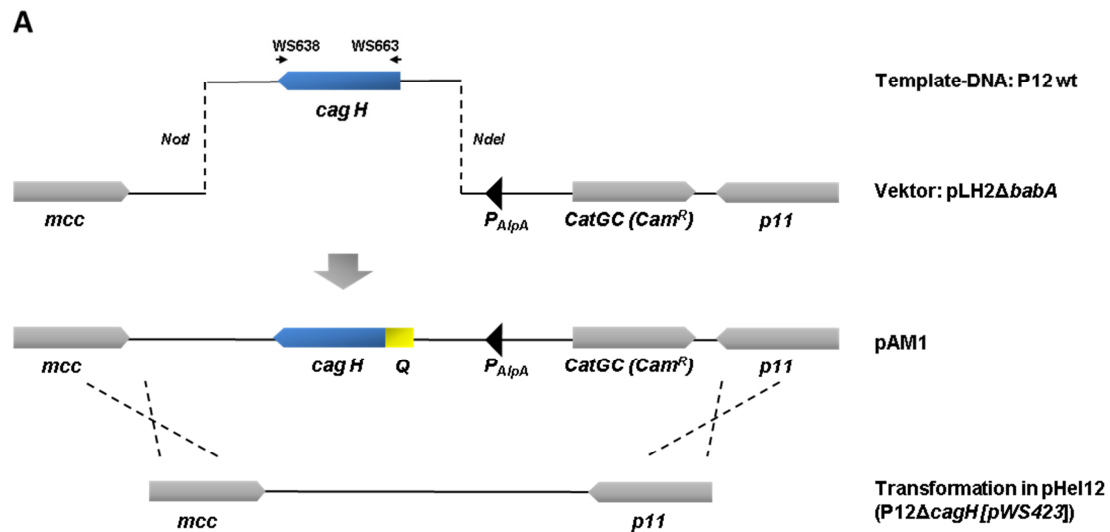


Abbildung 4.1.1: Generierung von *H. pylori*-Mutanten mit einem mit CagH fusionierten Q-Tag

Unter Verwendung der Primer WS638 und WS663 wurde der N-Terminus von CagH mit einem Q-Tag fusioniert. Dieses Konstrukt wurde anschließend in eine P12ΔcagH-Mutante transformiert, wo es unter der Kontrolle des alpA-Promotors produziert wurde.

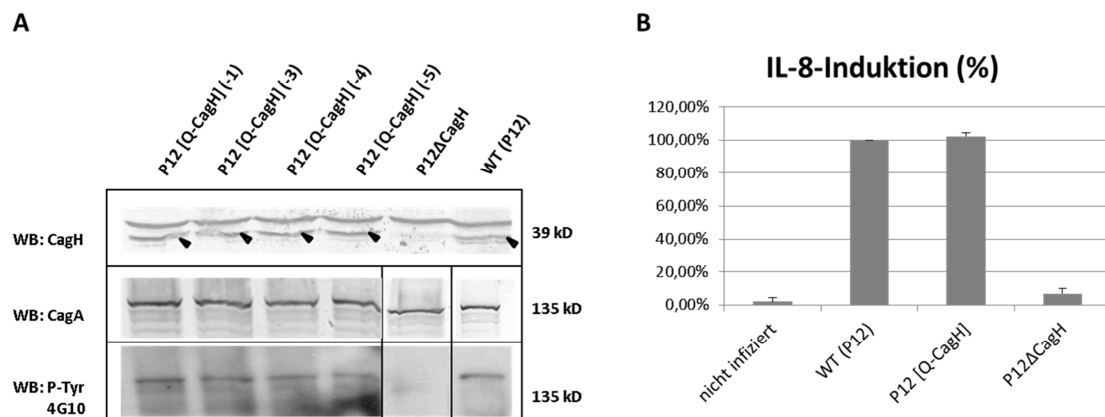


Abbildung 4.1.2: Funktionelle Analyse der *H. pylori*-Mutanten mit einem mit CagH fusionierten Q-Tag

(A) Ganzzell-Lysate der dargestellten *H. pylori*-Mutanten wurden mittels SDS-PAGE und darauffolgendem Immunoblot auf Produktion von CagH und CagA analysiert. Infektionsansätze mit AGS-Zellen wurden auf Produktion Tyrosin-phosphorylierten CagA's analysiert. (B) AGS-Zellkulturüberstände von Infektionsansätzen der dargestellten *H. pylori*-Mutanten wurden mittels ELISA auf sezerniertes IL-8 analysiert. Die IL-8-Induktion ist in Relation zum WT (P12) in Prozent angegeben.

4.1.2 Generierung von *H. pylori*-Mutanten mit einem mit CagL fusionierten Q-Tag

Zur Konstruktion des Plasmids pAM2 wurde das Gen *cagL* mit Hilfe des Primerpaares WS662 und WS643 vom *template*-Plasmid pWS255 durch inverse PCR amplifiziert und anschließend rückligiert. Dadurch wurde ein Q-Tag hinter die für die N-terminale Signalsequenz kodierende DNA kloniert, Aminosäureposition 22 (Abbildung 4.1.3). Nach erfolgter Sequenzierung wurde pAM2 in eine *H. pylori*Δ*cagL*-Mutante transformiert, wo es in den *recA*-locus integriert und unter der Kontrolle des *cagA*-Promotors produziert wurde. Die funktionelle Analyse der generierten Mutanten geschah analog zu der Überprüfung der *H. pylori*-Mutanten mit einem mit CagH fusionierten Q-Tag (siehe Kapitel 4.1.1). Die Ergebnisse zeigen, dass die generierten Mutanten CagL und CagA in einer mit dem Wildtyp vergleichbaren Menge produzieren und, dass CagA bei Infektionsexperimenten mit AGS-Zellen auch Tyrosinphosphoryliert wird (Abbildung 4.1.4 A). Auch die IL-8-Induktion, nachgewiesen durch Untersuchung von AGS-Zellkulturüberständen nach Infektionsexperimenten mit den dargestellten *H. pylori*-Stämmen mittels ELISA, entspricht dem des Wildtyps P12 (Abbildung 4.1.4 B). Die Ergebnisse zeigen, dass auch die Fusion von CagL mit einem Q-Tag keinen negativen Effekt auf die Funktionalität des Typ IV-Sekretionssystems ausübt.

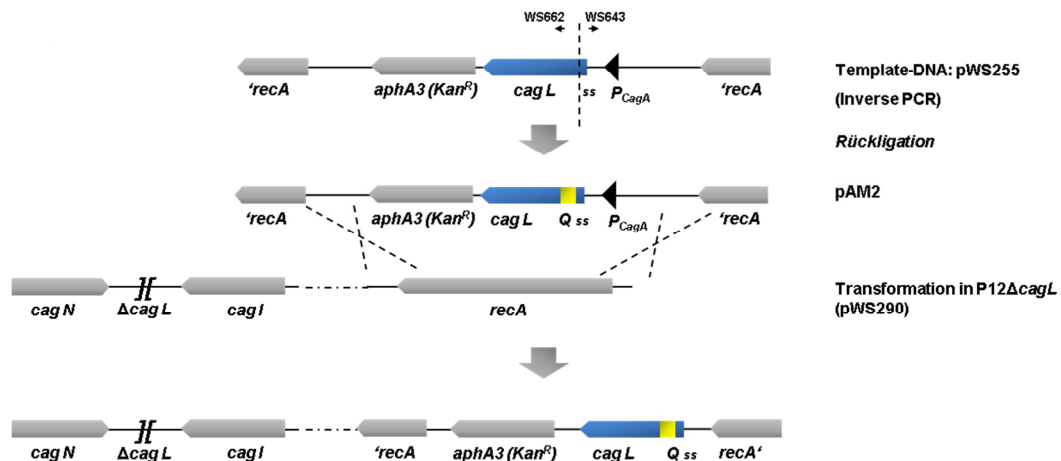


Abbildung 4.1.3: Generierung von *H. pylori*-Mutanten mit einem mit CagL fusionierten Q-Tag

Unter Verwendung der Primer WS662 und WS643 wurde der N-Terminus von CagL mit einem Q-Tag fusioniert. Dieses Konstrukt wurde anschließend in eine P12ΔcagL-Mutante transformiert, wo es in den recA-locus eingebaut und unter der Kontrolle des cagA-Promotors produziert wurde.

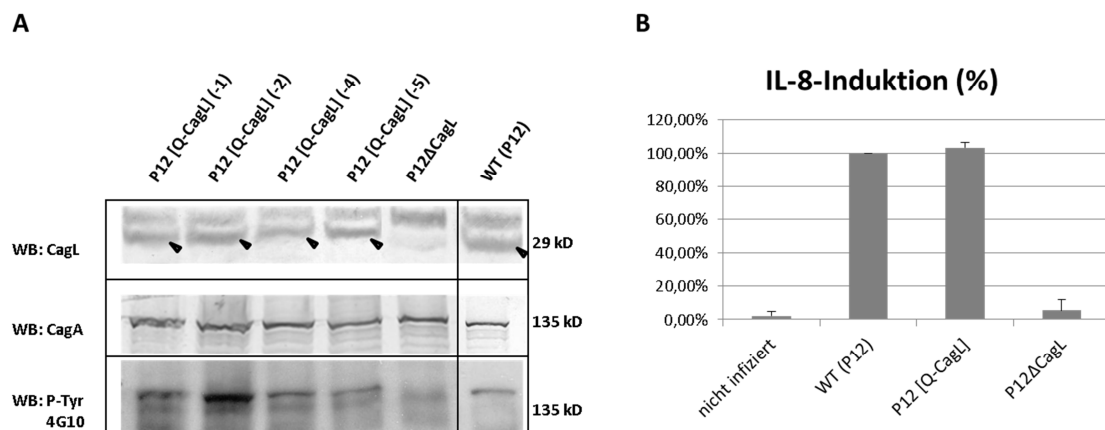


Abbildung 4.1.4: Funktionelle Analyse der *H. pylori*-Mutanten mit einem mit CagL fusionierten Q-Tag

(A) Ganzzell-Lysate der dargestellten *H. pylori*-Mutanten wurden mittels SDS-PAGE und darauffolgendem Immunoblot auf Produktion von CagL und CagA analysiert. Infektionsansätze mit AGS-Zellen wurden auf Produktion Tyrosin-phosphorylierten CagA's analysiert. (B) AGS-Zellkulturüberstände von Infektionsansätzen der dargestellten *H. pylori*-Mutanten wurden mittels ELISA auf sezerniertes IL-8 analysiert. Die IL-8-Induktion ist in Relation zum WT (P12) in Prozent angegeben.

4.1.3 Visualisierung des mit CagH bzw. CagL fusionierten Q-Tags

Nun sollten die mit einem Q-Tag fusionierten Proteine visualisiert werden. Nach Inkubation der Bakterien-Suspensionen mit dem Enzym gp-Transglutaminase und dem an das Substrat Cadaverin ligierten Fluoreszenzfarbstoff FITC (siehe Kapitel 3.4.5) wurden die Mutanten fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Als Negativkontrolle wurde der Wildtyp-Stamm P12 verwendet. Leider zeigte sich, dass trotz wiederholter Versuche keine differenzierte Anfärbung der gewünschten Proteine möglich war (Abbildung 4.1.5 A). Alternativ wurde versucht zuerst die Bakterien-Mutanten durch Ultraschall-Behandlung aufzuschließen, sie anschließend unter Lichtausschluss mit Transglutaminase und FITC-Cadaverin zu inkubieren und das Bakterienlysat anschließend über SDS-PAGE in die einzelnen Proteinbanden aufzutrennen. Mit Hilfe des ChemiDoc™ MP Imaging-Systems sollte dann eine fluoreszierende Bande mit der Größe von 29 kD, entsprechend CagL mit fusioniertem Q-Tag, bzw. 39 kD, entsprechend CagH mit fusioniertem Q-Tag, sichtbar sein. Auch diese Herangehensweise schlug fehl, da ebenfalls in der Negativkontrolle P12 eine unspezifische Interaktion von FITC-Cadaverin mit verschiedenen Wildtyp-*H. pylori*-Proteinen stattfand (Abbildung 4.1.5 B).

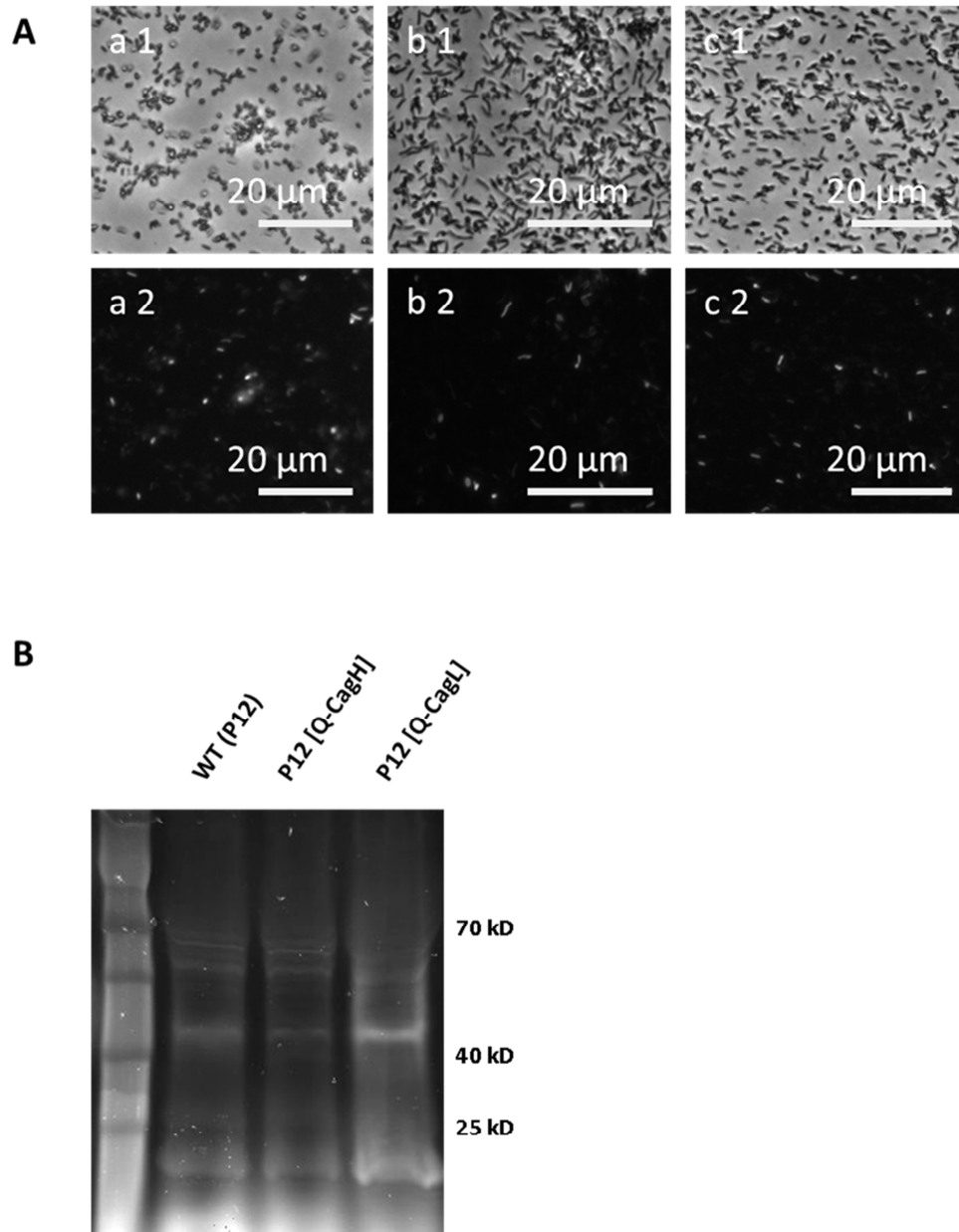


Abbildung 4.1.5. Visualisierung der *H. pylori*-Mutanten mit einem mit CagH bzw. CagL fusionierten Q-Tag
 (A) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen nach FITC-Cadaverin-Labeling der *H. pylori*-Mutanten P12 [Q-CagH] (a1, a2), P12 [Q-CagL] (b1, b2) und dem Wildtyp-Stamm P12 (c1, c2) als Negativkontrolle. Mikroskopische Aufnahmen der Bakterienproben im Phasenkontrast (a1, b1, c1). Mikroskopische Aufnahmen der Bakterienproben durch grünen Filter (a2, b2, c2). (B) Bildgebung eines Polyacrylamid-Gels mit dem ChemiDoc™ MP Imaging System nach vorangegangenen Labeling der dargestellten Bakterienlysate mit FITC-Cadaverin und anschließender Auftrennung durch SDS-PAGE.

4.1.4 Generierung von *H. pylori*-Doppelmutanten mit einem mit CagH

fusionierten M45- bzw. HA-Tag und einem mit CagL fusionierten myc-Tag

Nachdem die Visualisierung von CagH und CagL mittels fusionierter Q-Tags nicht erfolgreich war, wurde ein neuer experimenteller Ansatz verfolgt. Da die beiden Proteine durch Fusion der Tags zuvor nicht in ihrer Funktion gestört wurden, wurden die Insertionsstellen für die Q-Tags im Genom beibehalten und nun mit den Epitop-Tags Hemagglutinin (HA), M45 und myc versehen. Im Gegensatz zum Q-Tag werden diese nicht durch das Enzym Transglutaminase sondern durch spezifische Antikörper mit einem fluoreszierenden Farbstoff markiert. Des Weiteren wurden *H. pylori*-Doppelmutanten erzeugt. Ziel war es, CagH und CagL innerhalb einer Bakterienzelle zu visualisieren und dadurch einen noch größeren Informationsgewinn, z.B. in Bezug auf eine Interaktion der beiden Proteine, zu erhalten.

Zur Konstruktion des Plasmids pAM3, welches die genetischen Informationen für CagH mit fusioniertem M45-Tag enthält, wurde das Gen *cagH* mit Hilfe des Primerpaares WS672 und AM01 von der *template*-DNA P12 WT amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *NotI* in den Expressionsvektor pWS546 Δ *cagHIL* ligiert. In gleicher Weise wurde parallel dazu das Plasmid pAM4 konstruiert, welches die genetischen Informationen für CagH mit fusioniertem HA-Tag enthält. Dafür wurde das Gen *cagH* mit Hilfe des Primerpaares WS672 und AM02 von der *template*-DNA P12 Wildtyp amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *NotI* in den Expressionsvektor pWS546 Δ *cagHIL* ligiert. Die resultierenden Plasmide pAM3 und pAM4 wurden jeweils in eine *H. pylori* Δ *cagHIL*-Mutante transformiert, wo sie unter der Kontrolle des *alpA*-Promotors produziert wurden (Abbildung 4.1.6). Anschließend wurden die generierten *H. pylori*-Mutanten zusätzlich mit dem Plasmid pWS569 transformiert, welches analog zu pAM2 (siehe Kapitel 4.1.2) hergestellt wurde, jedoch die genetischen Informationen für einen myc-Tag anstelle eines Q-Tags enthielt. Das Plasmid wurde in der Zielbakterienzelle in den *recA*-locus integriert, wo dessen genetische Informationen unter der Kontrolle des *cagA*-Promotors exprimiert wurden (Abbildung 4.1.7). Zur funktionellen Analyse der generierten *H. pylori*-Doppelmutanten wurden Ganzzell-Lysate hergestellt, welche mittels SDS-PAGE und darauffolgendem

Immunoblot auf Expression von myc-CagL und M45- bzw. HA-CagH analysiert wurden. Dazu wurden α -myc- sowie α -M45- bzw. α -HA-Antiseren verwendet. Als Kontrolle wurde ein Wild-typ-*H. pylori*-Stamm mitgeführt. Die Ergebnisse zeigen, dass die generierten Doppel-mutanten CagH mitsamt dem jeweils fusionierten Epitop-*Tag* sowie myc-CagL produzieren (Abbildung 4.1.8 A und B). Die per Immunoblot nachweisbaren Proteinmengen scheinen vergleichbar mit der des Wildtyps zu sein. Durch Untersuchung mittels TEM-1-Translokations-*Assay* von AGS-Zellkultur-überständen nach Infektionsexperimenten mit den dargestellten *H. pylori*-Doppel-mutanten konnte gezeigt werden, dass die CagA-Translokationseffizienz bei beiden *H. pylori*-Stämmen nahezu dem des Wildtyps entspricht (Abbildung 4.1.8 C). Die Ergebnisse zeigen, dass die Fusion von CagH mit einem M45- bzw. HA-*Tag* sowie die Fusion von CagL mit einem myc-*Tag* keinen negativen Effekt auf die Funktion der generierten Doppelmutanten ausüben.

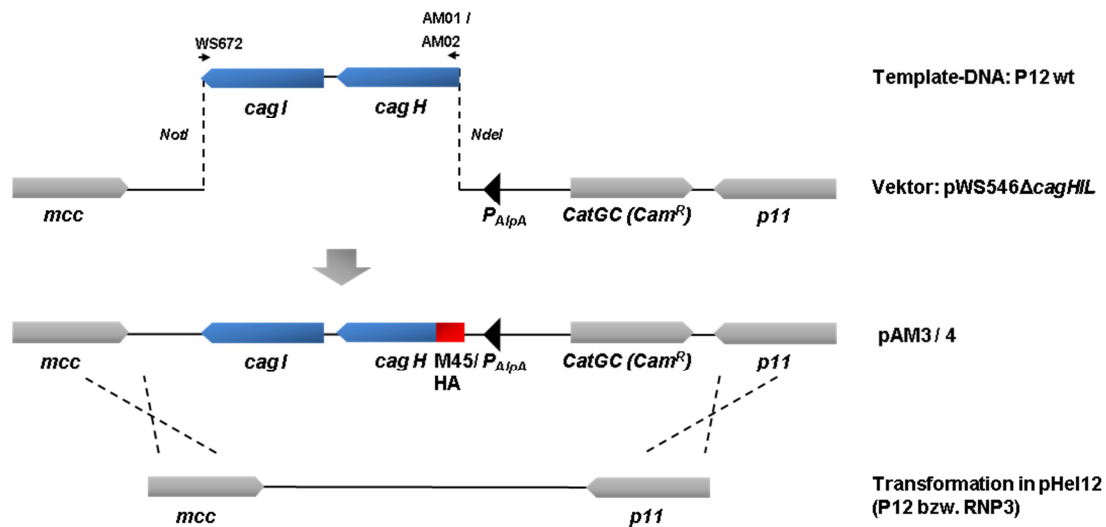


Abbildung 4.1.6: Generierung von *H. pylori*-Mutanten mit einem mit CagH fusionierten Epitop-Tag

Generierung von [M45/HA-CagH]-Fusionsproteinen. Unter Verwendung der Primer WS672 und AM01 bzw. AM02 wurde der N-Terminus von CagH mit einem M45 bzw. HA-Tag fusioniert. Dieses Konstrukt wurde anschließend sowohl in eine P12ΔcagHIL-Mutante, als auch in eine P12ΔcagHIL-Mutante mit Expression eines TEM-1-CagA-Fusionsproteins (RNP3) transformiert, wo die Gene jeweils unter der Kontrolle des alpA-Promotors exprimiert wurden.

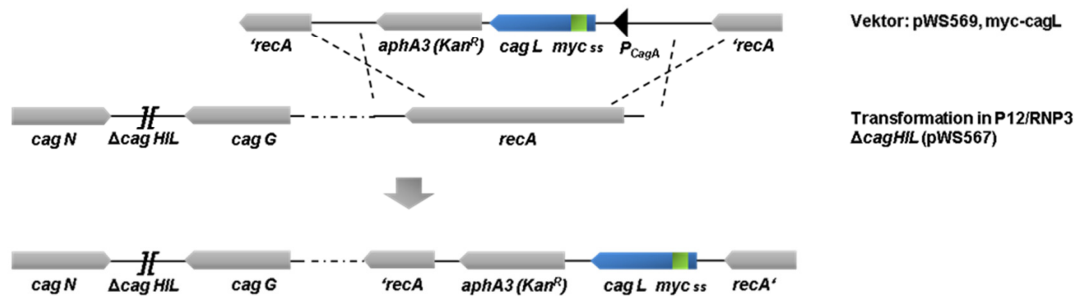


Abbildung 4.1.7: Generierung von *H. pylori*-Mutanten mit einem mit CagL fusionierten Epitop-Tag

Generierung von [myc-CagL]-Fusionsproteinen. Die zuvor generierten Mutanten (Abbildung 4.1.6) wurden mit einem Plasmid, das für die Expression eines myc-CagL-Fusionsproteins kodiert, transformiert. Das myc-cagL-Konstrukt wurde in den Zielzellen in den recA-Locus integriert, wo die genetische Information unter der Kontrolle des alpA-Promotors exprimiert wurde. Somit wurden P12- bzw. RNP3-Doppelmutanten generiert, mit einem mit CagH fusionierten M45- bzw. HA-Tag, sowie einem mit CagL fusionierten myc-Tag.

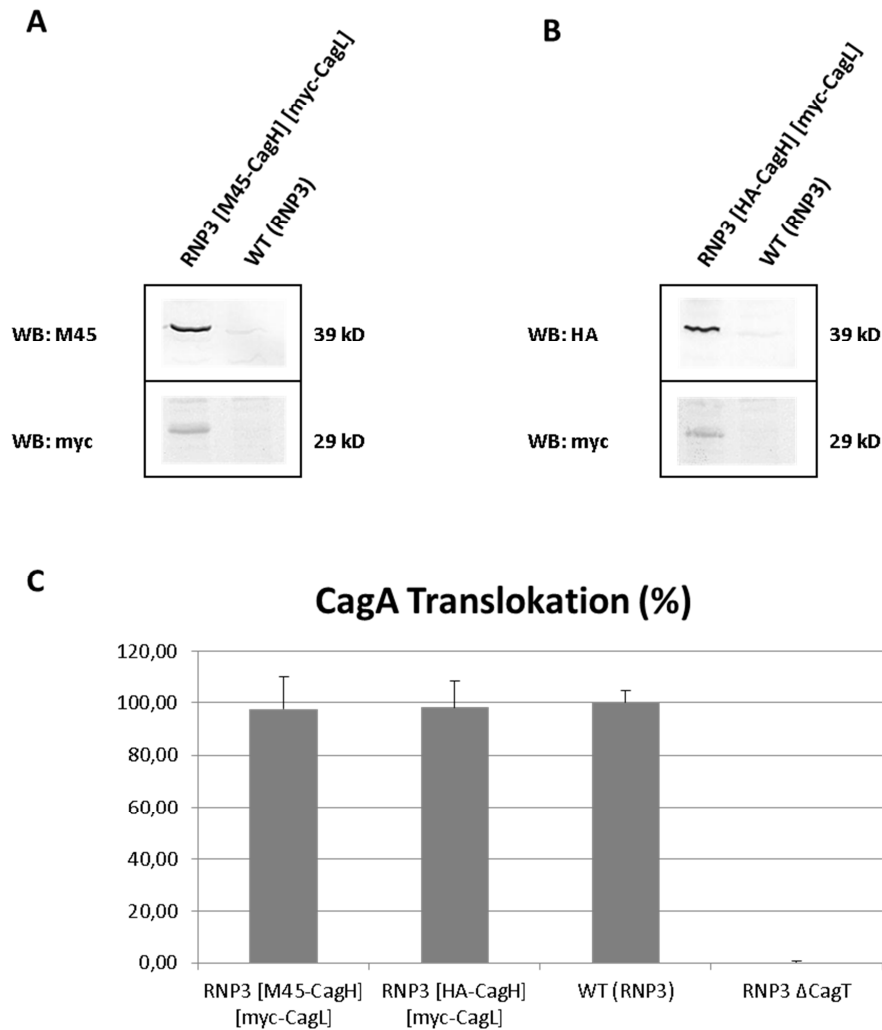


Abbildung 4.1.8: Funktionelle Analyse der [M45/HA-CagH] [myc-CagL]-Doppelmutanten

(A), (B) Ganzzell-Lysate der dargestellten *H. pylori*-Mutanten wurden mittels SDS-PAGE und darauffolgendem Immunoblot auf Expression von [M45-CagH] bzw. [HA-CagH] sowie [myc-CagL] analysiert. (C) CagA-Translokation (%) von RNP3-Mutanten mit [M45/HA-CagH] und [myc-CagL]. Die CagA-Translokationseffizienz wurde durch Infektionsexperimente mit AGS-Zellen und subsequenter Analyse mittels TEM-1-Translokations-Assay ermittelt. Sie ist in Relation zum WT (RNP3) in Prozent angegeben. Die dargestellten Daten stellen den statistischen Mittelwert aus mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten dar.

4.1.5 Visualisierung von Epitop-getaggttem CagH und Epitop-getaggttem CagL mittels Immunfluoreszenz

Nun war das Ziel die *H. pylori*-Doppelmutanten mit einem an CagH sowie CagL fusionierten Epitop-Tag unter dem Konfokalmikroskop zu visualisieren. Dadurch sollten die Expression sowie das Verteilungsmuster der beiden Proteine auf bzw. in der Bakterienzelle dargestellt werden. Dafür wurden die zu untersuchenden Proteine mit Antikörpern markiert, welche wiederum von einem Zweitantikörper, der selbst an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt wurde, erkannt wurde (siehe Kapitel 3.5.3). Zur Markierung von M45- bzw. HA-CagH wurde der rote Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor® 555 verwendet, zur Markierung von myc-CagL wurde der grüne Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor® 488 verwendet. Die Bakterielle DNA ist nach Anfärbung mit DAPI in blau dargestellt (Abbildung 4.1.9). Die Ergebnisse zeigen, dass CagH und CagL durch die Fusion mit Epitop-Tags selektiv angefärbt werden konnten. Das Expressionsmuster ergibt im direkten Vergleich von permeabilisierten und nicht-permeabilisierten Proben keinen Unterschied, was ein Hinweis dafür sein könnte, dass diese Proteine auf der Oberfläche der Bakterienzellen exponiert werden. Außerdem legen die Ergebnisse den Anschein nahe, dass besonders CagL eigenständig in einem regelmäßigen Muster auf der Bakterienoberfläche verteilt ist. CagH hingegen konnte nur in direkter Nähe zu CagL auf der Bakterienoberfläche lokalisiert werden. So konnte das emittierte Signal von CagH entweder genau neben einem CagL-Signal detektiert werden, sodass ein rotes Signal genau neben einem grünen Signal abgebildet wurde, oder überlagernd mit einem CagL-Signal, sodass ein gelbes Signal abgebildet wurde. Das gelbe Signal, welches eventuell einen Hinweis auf eine direkte Interaktion zwischen CagH und CagL geben könnte, schien dabei vor allem an den Bakterienpolen lokalisiert zu sein. Die Experimente wurden sowohl mit der [M45-CagH] [myc-CagL]- als auch der [HA-CagH] [myc-CagL]-Doppelmutante mehrfach durchgeführt. Dabei schienen sich im Expressionsmuster zwischen den beiden Mutanten keine Unterschiede zu ergeben. Im direkten Vergleich scheint jedoch eine schwächere Detektion des α HA-Antikörpers im Vergleich zum α M45-Antikörper durch Alexa Fluor® 555 vorzuliegen. Als Negativkontrolle wurde ein WT-*H. pylori*-Stamm mitgeführt (Abbildung 4.1.9, I).

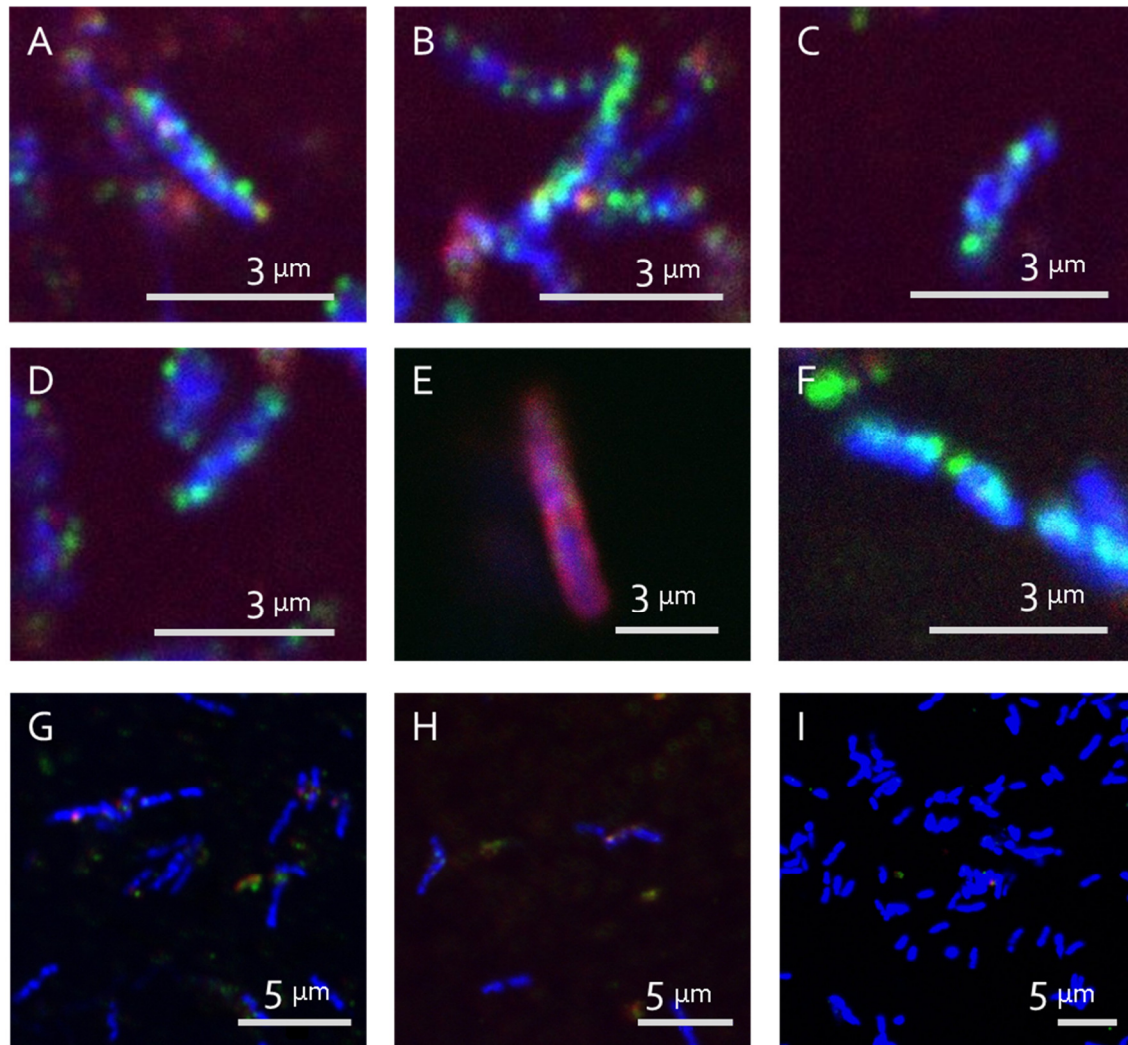


Abbildung 4.1.9: Visualisierung der [M45/HA-CagH] [myc-CagL]-Doppelmutanten

Konfokalmikroskopische Aufnahmen nach Doppel-Immunfluoreszenzfärbung der *H. pylori*-Stämme RNP3 [M45-CagH] [myc-CagL] (A bis F), RNP3 [HA-CagH] [myc-CagL] (G, H) und der Negativkontrolle RNP3 (I). Die Mutanten wurden durch Bindung von rotem Alexa Fluor® 555 an α M45 (A bis F) bzw. α HA (G, H), Bindung von grünem Alexa Fluor® 488 an α myc (A bis H) und Bindung von Alexa Fluor® 647 an α *H. pylori* (E; dargestellt in pink) markiert. Die Anfärbung der bakteriellen DNA geschah mit DAPI (dargestellt in blau). Zur Detektion intrazellulärer Proteine wurden die Bakterienzellen vor der Doppel-Immunfluoreszenzfärbung mit Triton X-100 permeabilisiert (F, H, I).

4.2 Interaktionen von CagH, CagI und CagL

Bereits frühere Experimente gaben Hinweise darauf, dass CagH, CagI und CagL miteinander interagieren, da bei Experimenten mit Deletion eines einzelnen Proteins aus besagter Gruppe auch die übrigen beiden Proteine nur in einem geringeren Maß produziert wurden (Pham et al., 2012). Durch die Spezifität der gegen die Epitop-*Tags* wirksamen Antikörper sollte diese Vermutung bestätigt werden sowie der Ort der Interaktion in der Bakterienzelle ermittelt werden. Dazu wurden von den [HA-CagH] [myc-CagL]- und [M45-CagH] [myc-CagL]-Doppelmutanten (siehe Kapitel 4.1.4) Bakterienlysate hergestellt und anschließend Immunpräzipitationen (siehe Kapitel 3.5.1) durchgeführt. Die Proteine wurden anschließend durch SDS-PAGE entsprechend ihrer Größe aufgetrennt und mittels Immunoblot analysiert.

4.2.1 Identifizierung interagierender Proteine durch Immunpräzipitation

Es wurden *H. pylori*-Zelllysate verwendet, welche durch einen detergenzienhaltigen Puffer und Ultraschallbehandlung erhalten wurden. Nicht aufgeschlossene Bakterienzellen wurden durch Zentrifugation abgetrennt. Aus dem Proteinlysate wurde CagH mittels des fusionierten HA- bzw. M45-*Tag* immunpräzipitiert und eine Co-Präzipitation von CagI durch Immunoblot nachgewiesen. Eine Co-Präzipitation von CagL konnte nur bei der [HA-CagH] [myc-CagL]-Doppelmutante nachgewiesen werden, bei [M45-CagH] [myc-CagL] lag die präzipitierte CagL-Menge unterhalb der mittels Immunoblot nachweisbaren Grenze (Abbildung 4.2.1). Aus diesem Grund wurden die sich anschließenden Immunpräzipitationen nur noch mit den Bakterienstämmen P12 [HA-CagH] [myc-CagL] und RNP3 [HA-CagH] [myc-CagL] durchgeführt. Durch die Immunpräzipitation mittels der eingebrachten Epitop-*Tags* konnte der unspezifische Hintergrund des Immunoblots im Vergleich zu einer Immunpräzipitation mittels CagH-Antiserum deutlich verringert werden. Analog dazu wurden Mutanten ohne vorangegangene Fusion von Epitop-*Tags* verarbeitet, welche somit als Negativkontrolle dienten. Die Ergebnisse stützten die Hypothese, dass CagH, CagI und CagL miteinander interagieren und in *H. pylori* einen Komplex bilden.

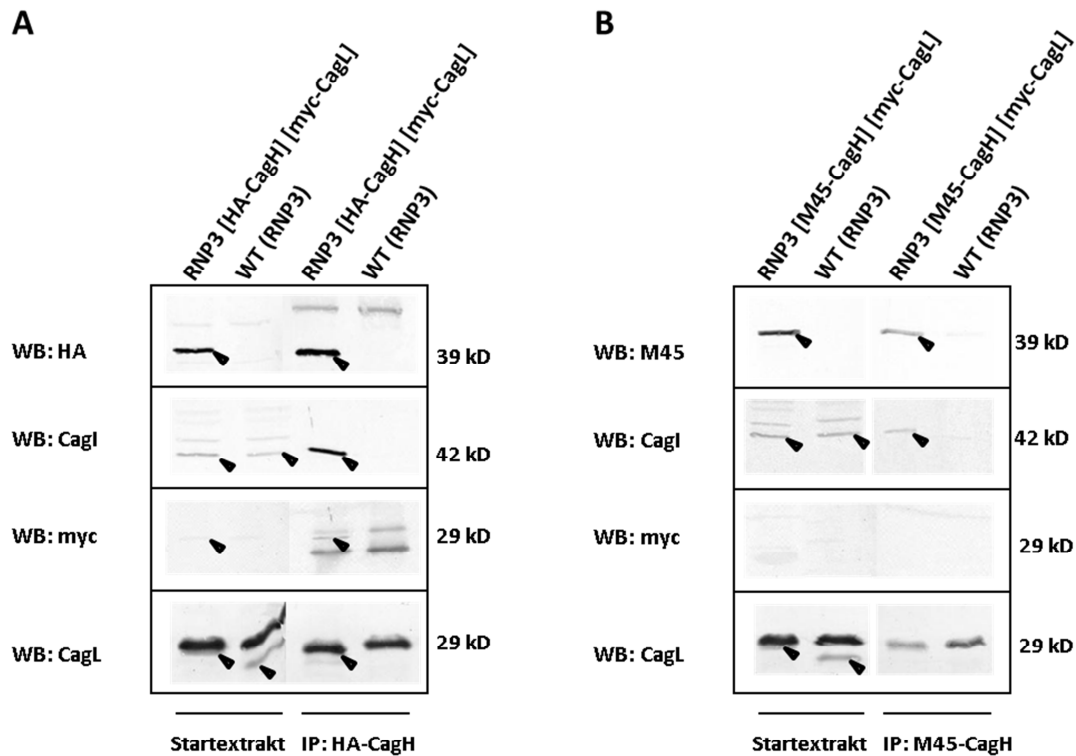


Abbildung 4.2.1: Identifizierung interagierender Proteine durch Immunpräzipitation.

Zelllysate der dargestellten *H. pylori*-Mutanten wurden durch detergentenhaltigen Puffer und Ultraschallbehandlung aufgeschlossen. Nachdem nicht-aufgeschlossene Bakterien durch Zentrifugation abgetrennt wurden, wurde aus dem Überstand CagH mittels des fusionierten HA- (A) bzw. M45-Tag (B) immunpräzipitiert. Eine Co-Präzipitation von CagI und CagL wurde mittels Immunoblot untersucht.

4.2.2 Identifizierung interagierender Proteine durch *tandem-affinity-purification*

Um den unspezifischen Hintergrund des Immunoblots noch weiter zu verringern wurde eine Präzipitation durchgeführt, die an das Vorgehen bei einer *tandem-affinity-purification* angelehnte wurde. Lysate der generierten Doppelmutanten wurden nacheinander mit Antikörpern gegen die beiden eingebrachten Epitop-Tags inkubiert, unterbrochen von einem Elutionsschritt, bei welchem die präzipitierten Proteine wieder in Lösung gebracht wurden (siehe Kapitel 3.5.2). Dabei wurde in einem ersten Schritt CagH mittels des fusionierten HA- bzw. M45-Tag immunpräzipitiert. Anschließend wurde das an die Protein G Agarose gebundene CagH mit Hilfe von Glycin wieder eluiert, um dann erneut aus der so gewonnenen Suspension CagL mittels des fusionierten myc-Tags zu immunpräzipitieren. Die Proben wurden anschließend durch

SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Immunoblot analysiert. Es konnte eine Co-Präzipitation von CagH und CagI nachgewiesen werden. Bei dem Stamm P12 [HA-CagH] [myc-CagL] war zusätzlich eine Co-Präzipitation von CagL nachweisbar. Bei den übrigen *H. pylori*-Mutanten lag die CagL-Menge unterhalb der Nachweisgrenze für den *Western Blot*. Eine deutliche Bande aller drei Proteine war nur bei dem *H. pylori*-Stamm P12 [HA-CagH] [myc-CagL] nachweisbar (Abbildung 4.2.2).

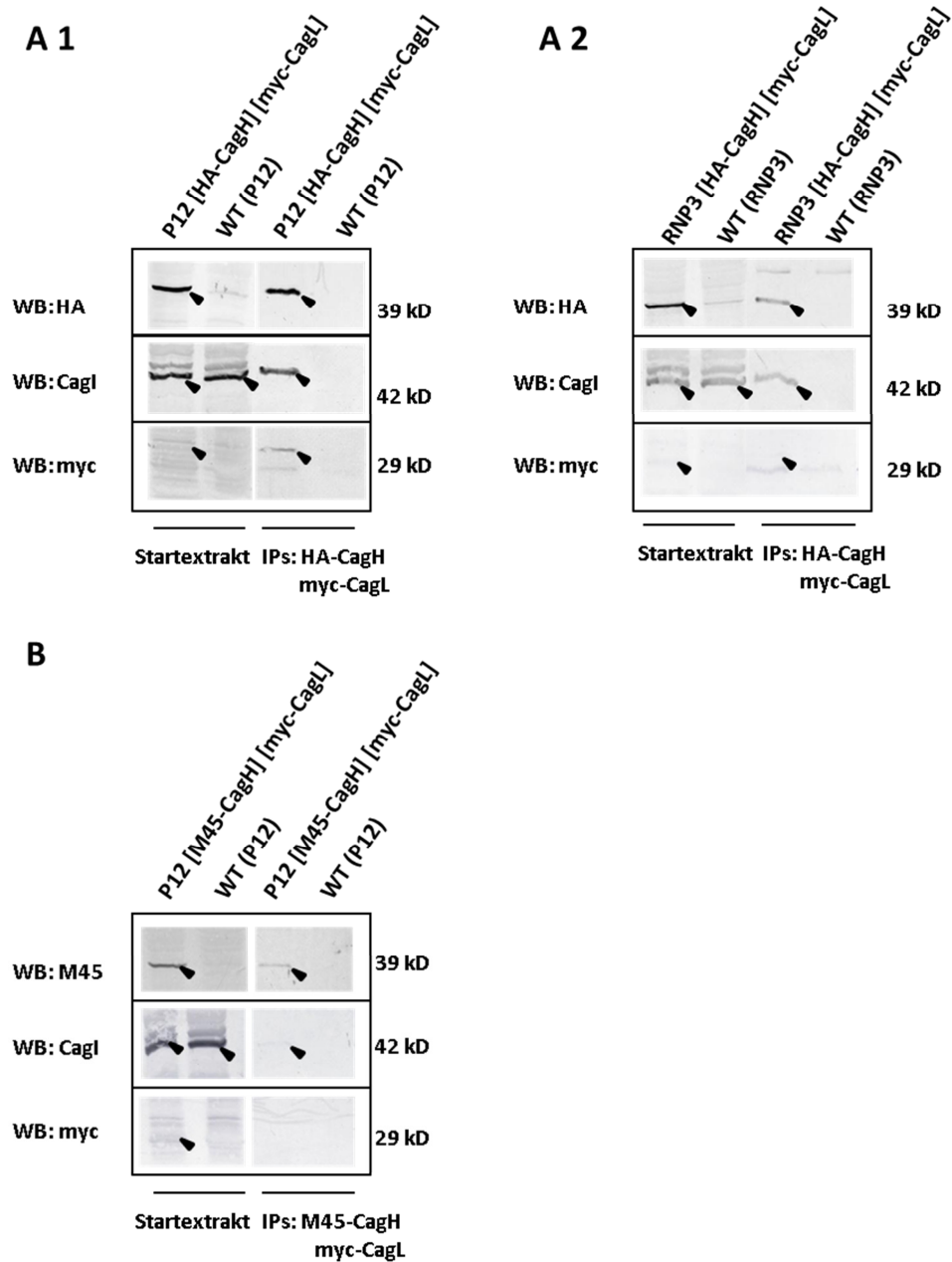


Abbildung 4.2.2: Identifizierung interagierender Proteine durch *tandem-affinity-purification*

Zelllysate der dargestellten *H. pylori*-Mutanten wurden durch detergentenhaltigen Puffer und Ultraschallbehandlung aufgeschlossen. Nachdem nicht-aufgeschlossene Bakterien durch Zentrifugation abgetrennt wurden, wurde aus dem Überstand CagH mittels des fusionierten HA- (A) bzw. M45-Tag (B) immunpräzipitiert. Anschließend wurde das an die Protein G Agarose gebundene CagH mit Hilfe von Glycin wieder eluiert, um dann erneut aus der so gewonnenen Suspension CagL mittels des fusionierten myc-Tags zu immunpräzipitieren. Eine Co-Präzipitation von CagH, CagI und CagL wurde mittels Immunoblot untersucht.

4.2.3 Ort der Interaktion

Nun sollten die im vorangegangenen Abschnitt etablierten Verfahren angewendet werden, um den Ort der Interaktion von CagH, CagI und CagL in der Bakterienzelle zu bestimmen. Dazu wurde nach Aufschluss der Zellen durch Ultraschallbehandlung eine Zellfraktionierung durch Ultrazentrifugation durchgeführt (siehe Kapitel 3.4.10). Hierbei wurden die löslichen Proteine, welche sich im Zyto- und Periplasma befinden, von den unlöslichen Proteinen, welche der inneren und äußeren Membran anhaften, separiert. Anschließend wurden die unlöslichen Proteine durch detergenzienhaltigen Puffer aus der Membran gelöst und das Proteinlysate einer weiteren Ultrazentrifugation unterzogen. Danach wurden beide Fraktionen mittels der mit CagH und CagL fusionierten Epitop-*Tags* durch *tandem-affinity-purification* präzipitiert. Im ersten Schritt wurde α HA-Antiserum zur Immunpräzipitation verwendet, im zweiten α myc-Antiserum. Die Proben wurden anschließend durch SDS-PAGE aufgetrennt und durch Immunoblot analysiert. Als Kontrolle wurden die Bakterienlysate vor Aufschluss durch Ultraschall sowie die Startextrakte (SE) vor Zellfraktionierung durch Ultrazentrifugation verwendet. Diese wurden ebenfalls durch Immunoblot analysiert. Die Ergebnisse zeigen, dass CagH, CagI und CagL erfolgreich im Startextrakt der löslichen Fraktion nachgewiesen wurden (Abbildung 4.2.3). Außerdem wurde in dieser Fraktion eine Komplexbildung dieser drei Proteine nachgewiesen. Im Startextrakt der unlöslichen Fraktion wurden CagH und CagI nachgewiesen, jedoch nicht CagL. Es wurden somit auch keine CagHIL-Komplexe in dieser Fraktion nachgewiesen.

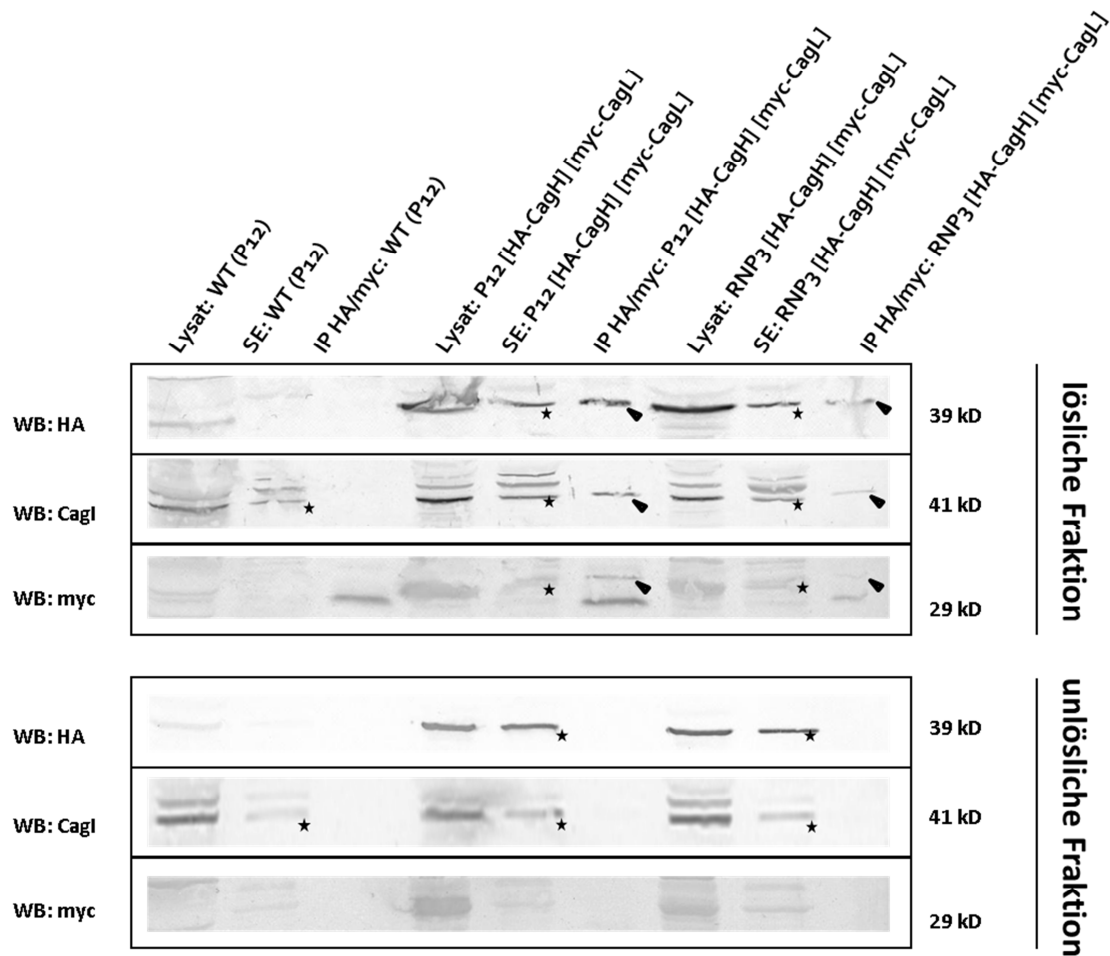


Abbildung 4.2.3: Lokalisation der Interaktion von CagH, CagI und CagL in der Bakterienzelle

H. pylori-Mutanten wurden durch Ultraschallbehandlung aufgeschlossen und anschließend mittels Ultrazentrifugation in eine unlösliche Gesamtmembranfraktion, welche sowohl die innere als auch die äußere Membran enthält, sowie eine lösliche aus Zytoplasma und Periplasma bestehende Fraktion aufgeteilt. Die membrangebundenen Proteine wurden anschließend durch detergentenhaltigen Puffer aus der unlöslichen Fraktion herausgelöst. Von beiden Fraktionen wurde ein Aliquot als Startextrakt (SE) abgenommen. Der Rest der Probe wurde jeweils einer *tandem-affinity-purification* unterzogen. Zuerst wurde CagH mittels des fusionierten HA-Tag immunpräzipitiert. Anschließend wurde das an die Protein G Agarose gebundene CagH mit Hilfe von Glycin wieder eluiert, um dann erneut aus der so gewonnenen Suspension CagL mittels des fusionierten myc-Tags zu immunpräzipitieren. Eine Co-Präzipitation von CagH, CagI und CagL in den unterschiedlichen Fraktionen wurde mittels Immunoblot untersucht. Detektierbare Proteinbanden der Startextrakte wurden mittels Stern (*) gekennzeichnet, detektierbare Proteinbanden nach erfolgter *tandem-affinity-purification* wurden mit Pfeil (▲) gekennzeichnet.

4.3 Nachweis funktioneller Domänen von CagH

CagH, CagI und CagL sind essentielle Proteine zur Translokation des Effektorproteins CagA in die Wirtszelle. Ihre Genbereiche werden auf der *cag*-Pathogenitätsinsel in einem gemeinsamen Operon, und dort mit teils überlappendem Leseraster, kodiert. Da CagI und CagL eine N-terminale Signalsequenz aufweisen, werden sie vermutlich über die innere Membran in das Periplasma sezerniert, von wo aus sie anschließend vermutlich teilweise auf die Bakterienoberfläche transportiert werden (Kutter et al., 2008; Pham et al., 2012; Shaffer et al., 2011). CagH hingegen enthält möglicherweise eine nahe dem N-Terminus lokalisierte Transmembran- (TM-) Domäne, über welche es in der inneren Membran verankert ist (Kutter et al., 2008). Es wurde prognostiziert, dass diese 23 Aminosäuren lang sei, Position 29 bis 51. Die ersten 28 Aminosäuren von CagH wurden im Zytoplasma vorhergesagt (Pham et al., 2012). Zur Eingrenzung essentieller Bereiche in Bezug auf die allgemeine Funktionsfähigkeit des T4SS, die Interaktion von CagH mit CagL sowie die Lokalisation von CagH in der Bakterienzelle, wurden *H. pylori*-Mutanten mit einer Reihe von definierten N-terminalen Deletionen an CagH generiert. Zusätzlich wurde der N-Terminus der Konstrukte jeweils mit einem *myc-Tag* fusioniert.

4.3.1 Generierung von *H. pylori*-Mutanten mit einem mit CagH fusionierten *myc-Tag*

Es wurden drei verschiedene CagH-Konstrukte mit einem *myc-Tag* fusioniert: *myc-cagH*, *myc-cagH* Δ 26N, bei welchem die vorhergesagte TM-Domäne somit erhalten wurde, und *myc-cagH* Δ 52N, bei welchem die vorhergesagte TM-Domäne deletiert wurde. Die auf diese Art generierten Plasmide wurden anschließend in einen *H. pylori* Δ *cagH*-Stamm transformiert, wo sie unter der Kontrolle des *alpA*-Promotors produziert wurden (Abbildung 4.3.1). Diese Mutanten produzierten somit ausschließlich das mit einem *myc-Tag* versehene, teilweise verkürzte, CagH-Protein. Parallel dazu wurden die *myc-cagH*-Konstrukte auch in einen Wildtyp *H. pylori*-Stamm transformiert, sodass die Mutanten neben den mit *myc-Tag* versehenen und teilweise N-terminal verkürzten *cagH*-DNA-Abschnitten auch immer noch die Bereiche enthielten, die für unverändertes, nicht artifiziell markiertes CagH kodierten.

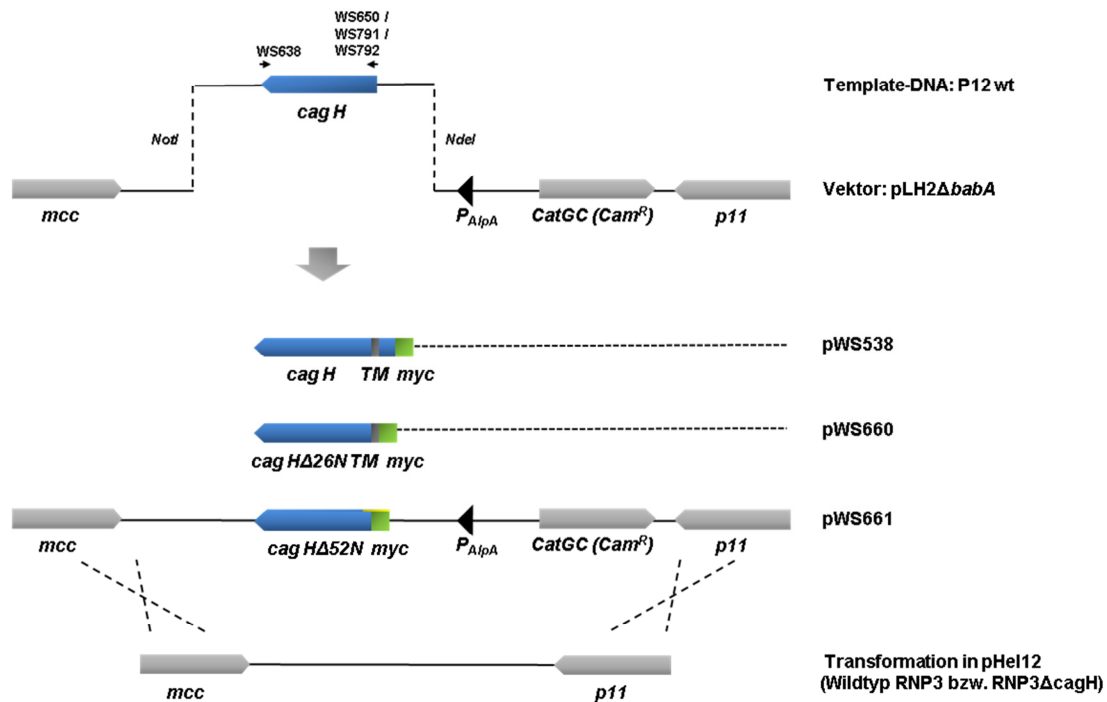


Abbildung 4.3.1: Generierung von *H. pylori*-Mutanten mit einem mit CagH fusionierten myc-Tag

Es wurden drei myc-*cagH*-Konstrukte generiert. Unter Verwendung der Primer WS638 und WS650 wurde der N-Terminus von CagH mit einem myc-Tag fusioniert. Unter Verwendung der Primer WS638 und WS791 wurde CagH N-terminal um 26 Aminosäuren verkürzt und mit einem myc-Tag fusioniert. Unter Verwendung der Primer WS638 und WS792 wurde CagH N-terminal um 52 Aminosäuren verkürzt und mit einem myc-Tag fusioniert. Die drei Konstrukte wurden anschließend sowohl in einen WT *H. pylori*-Stamm als auch in eine *H. pylori*Δ*cagH*-Mutante transformiert, wo sie unter der Kontrolle des *alpA*-Promotors produziert wurden.

4.3.2 Einfluss der Transmembran-Domäne und des N-terminalen Motivs auf die CagH-Produktion

Die CagH-Produktion der in Kapitel 4.3.1 generierten Mutanten wurde durch Immunoblots über anti-myc und anti-CagH Antikörper nachgewiesen (Abbildung 4.3.2). Die Ergebnisse zeigten, dass alle Mutanten myc-CagH exprimierten. Da die Fähigkeit zusätzlich unverändertes CagH zu produzieren bei Transformation des Konstrukts in den Wildtyp *H. pylori*-Stamm nicht beeinträchtigt sein sollte, wurde versucht, bei diesen durch Immunoblotting mit αCagH-Antiserum zwei separate CagH-Banden nachzuweisen (Abbildung 4.3.2 B). Dabei waren bei der [CagH] [myc-CagH]-Mutante zwei Proteinbanden sichtbar, eine [CagH]-Bande bei 39 kD und eine zusätzliche, schwerere [myc-CagH]-Bande. Immunoblots der [CagH] [myc-CagH Δ52N]-Mutante zeigten ebenfalls eine zusätzliche, in diesem Fall leichtere,

[myc-CagH $\Delta 52N$]-Bande. Bei Immunoblots der [CagH] [myc-CagH $\Delta 26N$]-Mutante mit α CagH-Antiserum konnte nur eine einzelne Bande auf Höhe von 39 kD nachgewiesen werden. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass [myc-CagH $\Delta 26N$] durch Deletion von 26 Aminosäuren vom N-Terminus aus und anschließender Fusion mit einem myc-Tag wieder eine fast identische Größe erreichte wie im Ausgangszustand und sich somit im Immunoblot mit der Wildtyp-CagH-Bande überlagerte. Die myc-*cagH*- sowie Wildtyp-*cagH*-Gene wurden bei den generierten Mutanten durch Sequenzierung überprüft (nicht abgebildet). Die Analyse durch Immunoblot zeigte, dass die myc-CagH-Proteine generell stärker produziert wurden als Wildtyp-CagH, insbesondere [myc-CagH] und [myc-CagH $\Delta 52N$]. Dies ist darauf zurückzuführen, dass das myc-*cagH*-Gen aufgrund der Integration in das Plasmid pHel12 in einer höheren Kopienzahl vorlag.

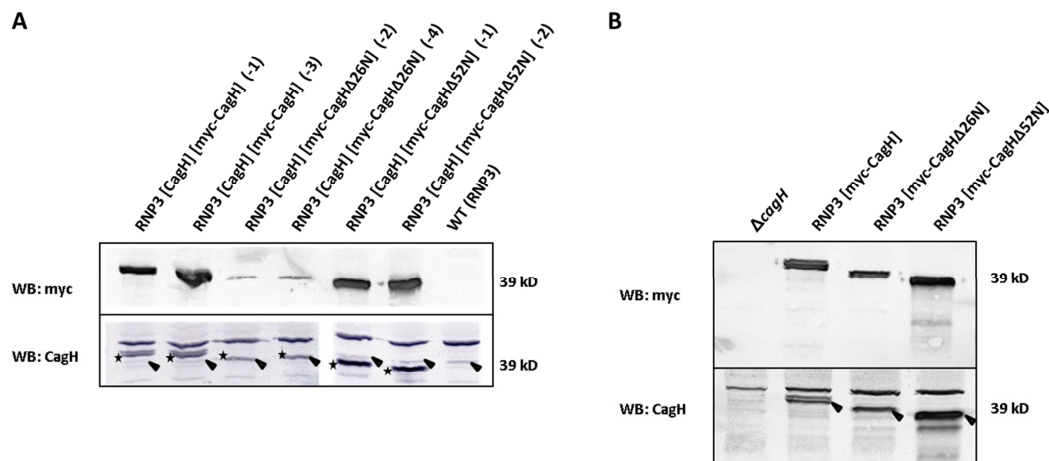


Abbildung 4.3.2: CagH-Produktion nach Transformation von myc-*cagH*-Konstrukten in *H. pylori*

(A) Ganzzell-Lysate der dargestellten *H. pylori*-Mutanten wurden mittels SDS-PAGE und darauffolgendem Immunoblot auf Produktion von CagH und myc-CagH analysiert. Im α CagH-Immunoblot wurde die [CagH]-Proteinbande mit einem Pfeil (◄) gekennzeichnet, die [myc-CagH]-Bande mit einem Stern (*). (B) Ganzzell-Lysate der dargestellten *H. pylori*-Mutanten wurden mittels SDS-PAGE und darauffolgendem Immunoblot auf Produktion von CagH und myc-CagH analysiert. Im α CagH-Immunoblot wurde die [myc-CagH]-Proteinbande mit einem Pfeil (◄) gekennzeichnet. Die weiter oben liegenden Banden stellen Kreuzreaktionen mit dem CagH-Antiserum dar.

4.3.3 CagA-Translokationseffizienz von myc-CagH-Mutanten

Infektionsexperimente von AGS-Zellen mit der [myc-CagH $\Delta 26N$]- bzw. der [myc-CagH $\Delta 52N$]-Mutante zeigten, dass sowohl durch alleinige Deletion des

N-Terminus als auch durch zusätzliche Deletion der vorhergesagten Transmembran-Domäne die Fähigkeit zur Translokation von CagA in die Wirtszelle verloren ging. Infektionsexperimente von AGS-Zellen mit [myc-CagH]-Mutanten zeigten, dass eine Translokation von CagA stattfand, wenngleich diese im Vergleich zum Wildtyp jedoch reduziert war (Abbildung 4.3.3).

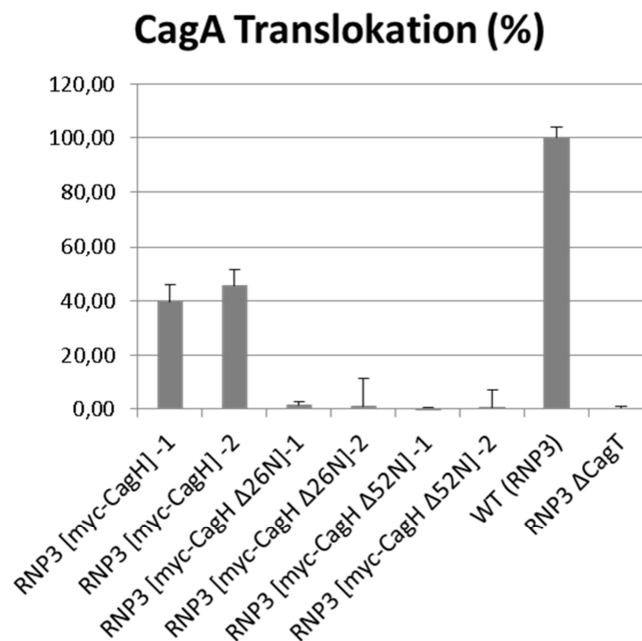


Abbildung 4.3.3: CagA-Translokation (%) nach Transformation von myc-cagH-Konstrukten in einen *ΔcagH-H. pylori*-Stamm

In infizierten AGS-Zellen wurde die translozierte Menge des Effektorproteins CagA mittels TEM-1-Translokations-Assay quantifiziert. Die CagA-Translokationseffizienz ist in Relation zum Wildtyp (RNP3) in Prozent angegeben. Die dargestellten Daten stellen den statistischen Mittelwert aus mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten dar.

Ziel war es nun herauszufinden, ob die CagA-Translokationskompetenz durch zusätzliche Produktion von Wildtyp-CagH erhalten bleiben würde. Das Ergebnis zeigt, dass die Fähigkeit zur Translokation von CagA in die Zielzelle lediglich bei der [CagH] [myc-CagH Δ52N]-Mutante erhalten blieb (Abbildung 4.3.4). Die Translokationseffizienz der [CagH] [myc-CagH]-Mutante lag nahezu unverändert bei 50 %, die der [CagH] [myc-CagH Δ26N]-Mutante bei 0 %.

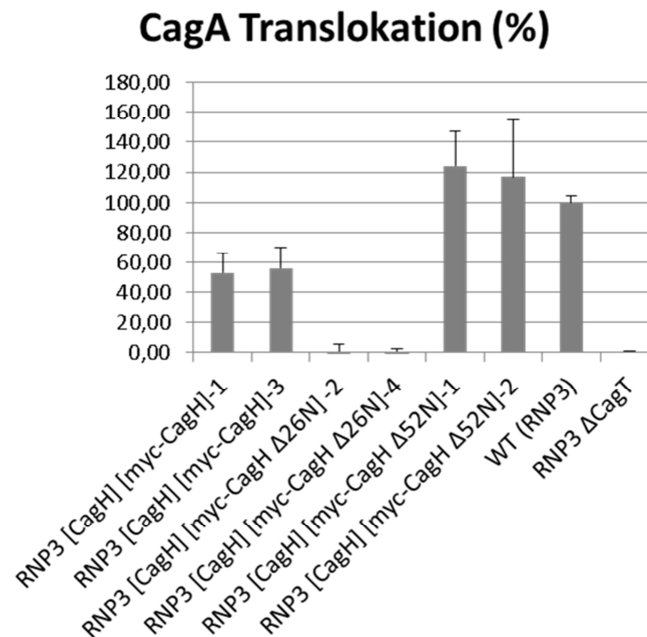


Abbildung 4.3.4: CagA-Translokation (%) nach Transformation von myc-cagH-Konstrukten in einen Wildtyp *H. pylori*-Stamm

In infizierten AGS-Zellen wurde die translozierte Menge des Effektorproteins CagA mittels TEM-1-Translokations-Assay quantifiziert. Die CagA-Translokation ist in Relation zum Wildtyp (RNP3) in Prozent angegeben. Die dargestellten Daten stellen den statistischen Mittelwert aus mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten dar.

4.3.4 Einfluss des N-terminalen Motivs und der Transmembran-Domäne von CagH auf die Interaktion mit CagL

Um einen möglichen Einfluss des N-terminalen Motivs und der Transmembran-Domäne von CagH auf die Interaktion mit CagL nachzuweisen, wurden Immunpräzipitationen durchgeführt (Abbildung 4.3.5). Dafür wurden Zelllysate der abgebildeten *H. pylori*-Mutanten durch einen detergenzienhaltigen Puffer und Ultraschallbehandlung aufgeschlossen und anschließend CagH mittels des fusionierten myc-Tags immunpräzipitiert. Nicht-aufgeschlossene Bakterienzellen wurden durch Zentrifugation abgetrennt. Die Proben wurden anschließend durch SDS-PAGE aufgetrennt und durch Immunoblot analysiert. Die Ergebnisse zeigen, dass myc-CagH, CagI sowie CagL erfolgreich im Startextrakt der drei zu untersuchenden *H. pylori*-Mutanten nachgewiesen werden konnten. Des Weiteren wurde eine Komplexbildung der drei Proteine in der [CagH] [myc-CagH]-, sowie der

[CagH] [myc-CagH $\Delta 26N$]-Mutante nachgewiesen. Bei der [CagH] [myc-CagH $\Delta 52N$]-Mutante erfolgte keine Interaktion von myc-CagH mit CagI und CagL.

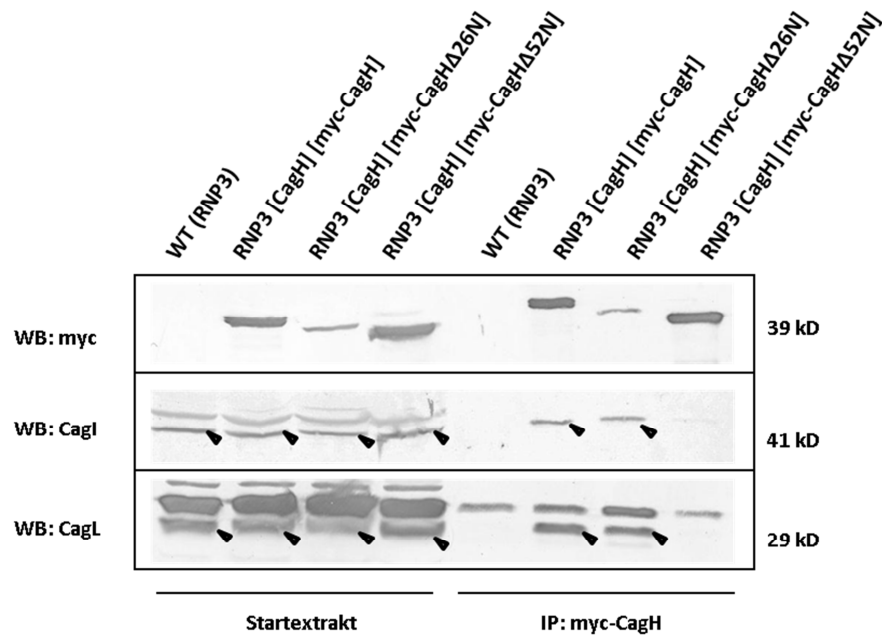


Abbildung 4.3.5: Identifizierung interagierender Proteine durch Immunpräzipitation

Zelllysate der dargestellten *H. pylori*-Mutanten wurden durch detergenzienhaltigen Puffer und Ultraschallbehandlung aufgeschlossen. Nachdem nicht-aufgeschlossene Bakterien durch Zentrifugation abgetrennt wurden, wurde aus dem Überstand CagH mittels des fusionierten myc-Tags immunpräzipitiert. Eine Co-Präzipitation von CagI und CagL wurde mittels Immunoblot untersucht.

4.3.5 Einfluss des N-terminalen Motivs und der Transmembran-Domäne von CagH auf dessen Verteilung in der Bakterienzelle

Nun war das Ziel die *H. pylori*-Mutanten unter dem Konfokalmikroskop zu visualisieren. Dadurch sollte der Einfluss des N-terminalen Motivs und der Transmembran-Domäne von CagH auf dessen Expressionsmuster in der Bakterienzelle dargestellt werden (Abbildung 4.3.6). Dafür wurden die zu untersuchenden *H. pylori*-Mutanten mit α myc-Antiserum markiert. Dieses wiederum wurde von einem Zweitantikörper, an den ein Farbstoff gekoppelt war, erkannt. Zur Markierung von myc-CagH wurde der grüne Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor® 488 verwendet. Die bakterielle DNA ist nach Färbung mit DAPI in blau zu sehen. Zur Visualisierung

intrazellulär befindlicher Proteine wurden die Bakterienstämme zusätzlich mit Triton X-100 permeabilisiert. Die Ergebnisse zeigen, dass in der Mutante RNP3 [CagH] [myc-CagH] erfolgreich fluoreszierende Foci auf der Bakterienoberfläche visualisiert wurden (Abbildung 4.3.6 A1, A2). In den *H. pylori*-Stämmen RNP3 [CagH] [myc-CagH Δ 26N] und RNP3 [CagH] [myc-CagH Δ 52N] war keine Visualisierung der verkürzten myc-CagH-Proteine auf der Bakterienoberfläche durch Immunfluoreszenz möglich (Abbildung 4.3.6 B1, C1). In beiden Stämmen konnte CagH jedoch durch Permeabilisierung der zu untersuchenden Mutanten im Bakterieninnern nachgewiesen werden (Abbildung 4.3.6 B2, C2). Als Negativkontrolle wurde ein WT-*H. pylori*-Stamm mitgeführt (Abbildung 4.3.6 D, E).

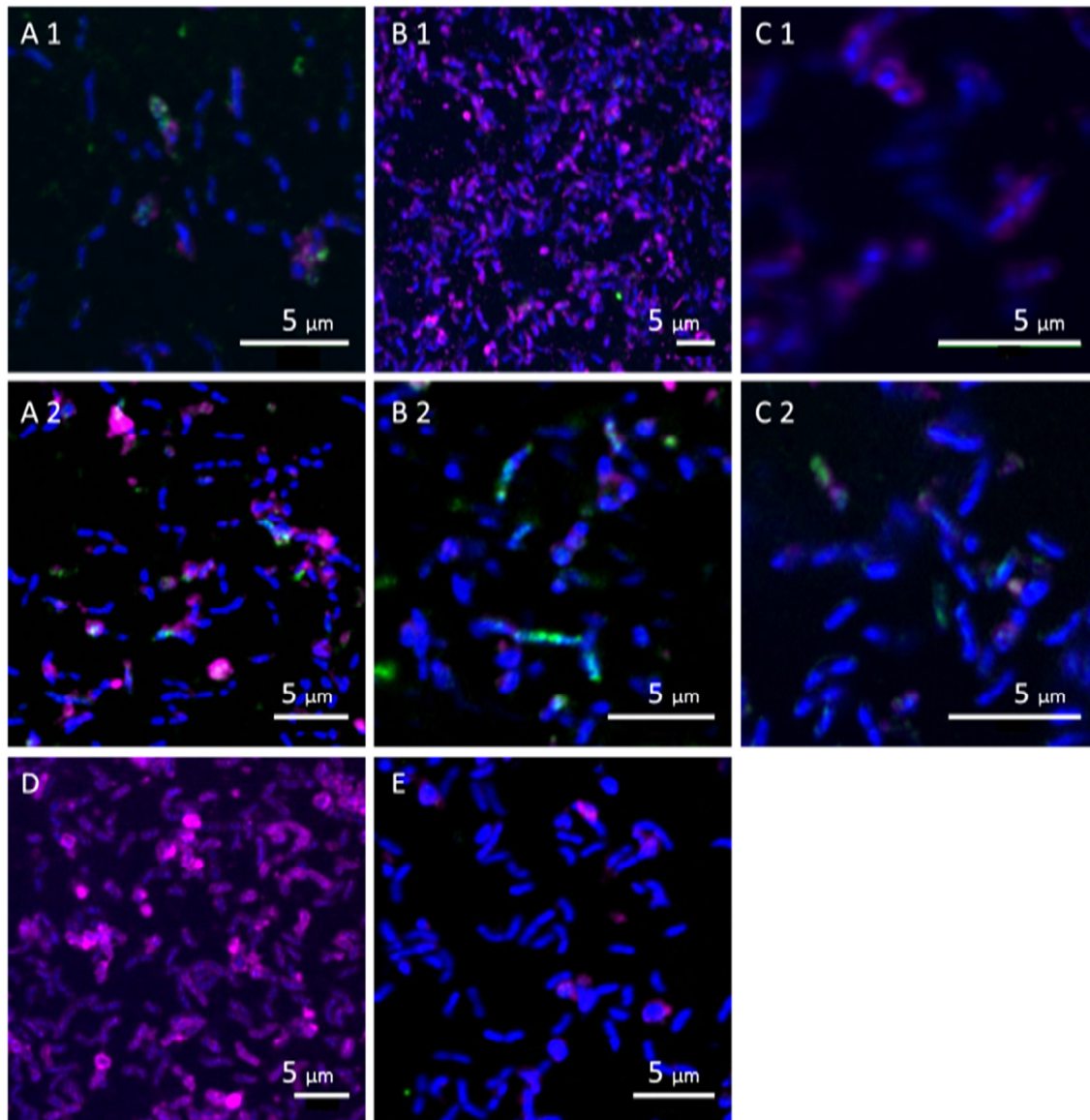


Abbildung 4.3.6: Einfluss der Verkürzung von CagH auf dessen Verteilung in der Bakterienzelle

Konfokalmikroskopische Aufnahmen nach Immunfluoreszenzfärbung der *H. pylori*-Mutanten RNP3 [CagH] [myc-CagH] (A1, A2), RNP3 [CagH] [myc-CagH Δ 26N] (B1, B2), RNP3 [CagH] [myc-CagH Δ 52N] (C1, C2) sowie dem Wildtyp-Stamm RNP3 (D, E) als Negativkontrolle. Die Bakterien wurden durch Bindung von grünem Alexa Fluor® 488 an amyc-CagH und Bindung von Alexa Fluor® 647 an *aH. pylori* (pink) markiert. Die Anfärbung der bakteriellen DNA geschah mit DAPI (blau). Zur Detektion auf der Bakterienoberfläche befindlicher Proteine wurden die Mutanten vor der Immunfluoreszenzfärbung nicht permeabilisiert (A1, B1, C1, D). Zur Detektion intrazellulärer Proteine wurden die Bakterienzellen mit Triton X-100 permeabilisiert (A2, B2, C2, E).

5 Diskussion

5.1 Die Rollen von CagH, CagI und CagL im Typ IV-Sekretionsapparat

Um einen Einblick in den komplexen Aufbau des T4SS zu erlangen, wurden bereits verschiedene Methoden, darunter die Elektronenmikroskopie, Röntgenkristallographie und Kernspinresonanz eingesetzt. Ein Großteil der Erkenntnisse stammt dabei aus der Erforschung von Aufbau und Bildung des P-Typ-Pilus von *A. tumefaciens*, welcher durch die T-DNA des tumorinduzierenden (Ti-) Plasmids kodiert wird. Das Sekretionssystem von *A. tumefaciens* ist aus zwölf Proteinen aufgebaut (VirB1 bis VirB11 sowie VirD4) und wird als Prototyp der Typ IV-Sekretionssysteme angesehen (Christie, 1997).

Die Pili von *A. tumefaciens* sind aus den zwei Proteinen VirB2 und VirB5 aufgebaut, wobei VirB2 den Hauptbestandteil darstellt (Aly & Baron, 2007; Eisenbrandt et al., 1999; Fullner et al., 1996; Lai & Kado, 1998; Schmidt-Eisenlohr et al., 1999). Dabei wird VirB2 zuerst als sogenanntes Pro-Pilin produziert, welches mittels eines Signalpeptids über die innere Membran transportiert wird, anschließend am N-Terminus verkürzt und schließlich in zyklischen VirB2-Untereinheiten angeordnet wird (Eisenbrandt et al., 1999; Hospenthal et al., 2017; Lai et al., 2002).

Auch TrbC, welches das VirB2-Ortholog des IncP-Pilus von *E. coli* darstellt, wird zunächst als Pro-Pilin produziert, nach einer N-terminalen Verkürzung, der eine zusätzliche C-terminale Verkürzung folgt, zyklisiert und schließlich als Pilusstruktur angeordnet (Eisenbrandt et al., 1999). Wegen prognostizierter Struktur- und Sequenzhomologien, wurde CagC als mögliches VirB2-Ortholog von *H. pylori* näher untersucht. Es konnte durch Immunfluoreszenz und elektronenmikroskopische Aufnahmen als Bestandteil multimerischer Strukturen auf der Bakterienoberfläche identifiziert werden. Durch Zellfraktionierung konnte es größtenteils in der Membranfraktion nachgewiesen werden (Andrzejewska et al., 2006). Obwohl CagC aufgrund der Tatsache, dass bei Deletion des Proteins weder die Translokation von

CagA in die Wirtszelle noch die Induktion von IL-8 stattfinden können, ein essentieller Bestandteil des *cag*-Systems von *H. pylori* ist, bleibt die Fähigkeit zur Pilusbildung in einer $\Delta cagC$ -Mutante bestehen (Johnson et al., 2014). Die Klärung der Funktion von CagC sowie die Bestimmung eines VirB2-Orthologs in *H. pylori* stehen somit noch aus.

VirB5 konnte durch Immunogold-Färbung an der Spitze des Pilus lokalisiert werden, was darauf hindeutet, dass es an der Etablierung eines Kontakts zur Wirtszelle beteiligt sein könnte (Aly & Baron, 2007). Außerdem hat es beim korrekten Einbau der VirB2-Proteine in den Pilus eine Funktion inne (Lai & Kado, 1998; Schmidt-Eisenlohr et al., 1999).

Die Kristallstruktur von TraC, dem VirB5-Ortholog des *E. coli*-Plasmids pKM101, zeigt, dass das Protein aus drei gebündelt angeordneten α -Helices und einem kugelförmigen Anhang von vier kürzeren Helices aufgebaut ist (Yeo et al., 2003). TraC wurde ebenfalls an der Pilus-Spitze nachgewiesen (Hapfelmeier et al., 2000; Krall et al., 2002). CagL, das VirB5-Ortholog des *H. pylori*-*cag*-Systems, ist ebenfalls an der Pilus-Spitze lokalisiert und interagiert dort mit Integrinen der Wirtszelle (Backert et al., 2008; Kwok et al., 2007). Interessanterweise lässt die Kristallstrukturanalyse von CagL jedoch eine andere Faltung erkennen als bei TraC, obwohl die Gensequenzen mehrerer konservierter Motive deutliche Homologien zu anderen bekannten VirB5-Orthologen aufweisen (Backert et al., 2008; Barden et al., 2013; Barden et al., 2014; Bonsor et al., 2015; Choi et al., 2015).

Für CagH hingegen, ein weiteres essentielles Protein für die Translokation des Effektorproteins CagA, existieren keine Homologien zum VirB/D-System von *A. tumefaciens* oder zu jeglichen anderen bekannten Proteinen (Fischer, 2011). Bei Deletion des *cagH*-Gens findet eine Pilus-Produktion zwar noch statt, die Pili erscheinen jedoch nicht nur stark verlängert und verdickt, sondern sind auch nicht mehr funktionell, da die Translokation von CagA in die Wirtszelle und die Induktion von IL-8 nicht mehr stattfinden. Außerdem konnte CagH, genau wie CagL, durch Elektronenmikroskopie und Durchflusszytometrie zumindest teilweise auf der Bakterienoberfläche nachgewiesen werden (Shaffer et al., 2011). Neben CagH und

CagL ist auch CagI essentiell für die Funktionalität des T4SS von *H. pylori* und nimmt eine bedeutende Rolle bei der Pilus-Bildung ein (Pham et al., 2012). Da die drei Proteine innerhalb der *cag*-Pathogenitätsinsel in einem gemeinsamen Operon organisiert sind und ein nahezu identisches C-terminales Motiv aufweisen, wird auch in Bezug auf die funktionelle Rolle der drei Proteine im T4SS ein Zusammenhang vermutet. Dass die C-terminalen Motive zur Funktion von CagH, CagI und CagL beitragen, konnte nachgewiesen werden. Ob es sich zum Beispiel um eine Bindungsstelle für einen gemeinsamen Interaktionspartner handeln könnte, ist allerdings noch nicht geklärt (Shaffer et al., 2011).

5.2 Eignung verschiedener Tags zur Untersuchung von CagH, CagI und CagL

Um die Lokalisation und die Interaktionspartner von CagH und CagL zu untersuchen, wurden die Proteine mit *Tags* fusioniert. Zunächst wurden erfolglose Anstrengungen unternommen, CagH und CagL mittels fusionierter Q-*Tags* zu visualisieren. Während die Generierung funktioneller *H. pylori*-Mutanten noch erfolgreich war, gelang die Visualisierung fluoreszierender Foci weder mittels Fluoreszenzmikroskopie noch durch elektrophoretische Auftrennung von Proteinlysaten (siehe Kapitel 4.1.3). Dieses Vorgehen basiert auf den Ergebnissen einer Studie, in der unterschiedliche Proteine, darunter CFP (*cyan fluorescent protein*) und EGFR (*epidermal growth factor receptor*), sowohl durch Immunoblot als auch mittels Immunfluoreszenz auf der Oberfläche von HeLa-Zellen erfolgreich markiert werden konnten (Lin & Ting, 2006). Dabei wurde das zu untersuchende Protein im Voraus mit einem sogenannten Q-*Tag* fusioniert. In der Studie wurden drei separate Q-*Tags* generiert. Diese waren aus sechs bis sieben Aminosäuren aufgebaute Peptide, darunter ein- bis dreimal hintereinander die Aminosäure Glutamin (PNPQLPF, PKPQQFM, GQQQLG). Diese diente als Substrat für das Enzym Transglutaminase, wodurch ein fluoreszenzmarkiertes Amin an die Seitenkette des Q-*Tags* ligiert und anschließend visualisiert werden konnte. In unserem Versuchsaufbau wurden an CagH bzw. CagL ein Q3-*Tag* (GQQQLG) fusioniert und durch Inkubation mit gp-Transglutaminase und Cadaverin gekoppeltem

Fluorescein-5-isothiocyanat (FITC) fluoreszenzmarkiert (siehe Kapitel 3.4.5). Eine mögliche Hypothese dafür, dass keine spezifischen Fluoreszenzsignale detektiert werden konnten, könnte eine zu geringe Sequenzspezifität der gp-Transglutaminase für den *Q-Tag* sein. Diese bewirkte unter bestimmten Bedingungen bereits in der 2006 durchgeführten Studie eine Markierung ungetaggtter Proteine (Lin & Ting, 2006). Ein möglicher Ansatzpunkt für eine künftige Adaptierung des von uns hier durchgeführten Labeling-Protokolls könnte somit die Verwendung der Transglutaminase Faktor XIIIa sein, welche eine höhere Substratspezifität aufweist (Gorman & Folk, 1981; Lin & Ting, 2006).

Der Vorteil des folgenden Versuchsaufbaus lag darin, dass durch die Fusion der zu untersuchenden Proteine CagH und CagL mit einem Epitop-*Tag* bei der anschließenden Auswertung durch Immunoblot, Immunfluoreszenz oder Immunpräzipitation der unerwünschte und unspezifische Hintergrund im Vergleich zur Verwendung der üblicherweise vorhandenen Antikörper gegen die Proteine nahezu vollständig beseitigt wurde. Dadurch gelang es reproduzierbare Ergebnisse bei Untersuchungen zur Lokalisation und Interaktion von CagH, CagI und CagL sowie beim Nachweis funktioneller Domänen von CagH zu generieren (siehe Kapitel 4.1.4, 4.3.1). Die verwendeten *Tags* HA, M45 und myc haben nur eine geringe Größe, sodass sie mit der Funktion der Proteine nicht interferieren. Epitop-*Tags* haben sich schon früher als nützliche Hilfsmittel bei der Erforschung von *H. pylori cag*-Proteinen erwiesen. Shaffer et al. fusionierten einen FLAG-*Tag* an CagI sowie einen HA-*Tag* an CagH bzw. CagL. Dadurch gelang es ihnen durch Massenspektrometrie und Immunpräzipitation nachzuweisen, dass die drei Proteine einen Komplex bilden. Dieselben *H. pylori*-Mutanten verwendeten sie weiterhin zur Erforschung der Lokalisation der drei Proteine. Der Verdau der Bakterienoberfläche mit Proteinase K und Experimente zur Zellfraktionierung gaben Hinweise darauf, dass die Proteine zumindest teilweise auf der Oberfläche exponiert werden. Eine Visualisierung der Proteine mit fusioniertem Epitop-*Tag* auf der Bakterienoberfläche durch Immunogold-Färbung misslang jedoch (Shaffer et al., 2011). Im selben Zeitraum wurde eine weitere Studie durchgeführt, welche mittels fusionierter Epitop-*Tags* die Rolle von CagI in der Bakterienzelle

untersuchte (K. T. Pham und W. Fischer, unveröffentlicht). Dabei gelang es zwar CagI mit einem myc-Tag zu fusionieren, jedoch erwies sich die Mutante in Immunpräzipitationsexperimenten nicht als funktionell, da es zu unspezifischen Kreuzreaktionen des myc-Antikörpers kam. Bei anderen *H. pylori*-Proteinen waren die Fusion mit einem myc-Tag sowie der spezifische Nachweis des Tags mittels Antikörper allerdings erfolgreich (Hare et al., 2007; Jurik et al., 2010).

5.3 Etablierung eines Protokolls zur Visualisierung von CagH und CagL auf der Oberfläche von *H. pylori*

Untersuchungen dieser Arbeit zur Lokalisation von CagH und CagL geben in Zusammenschau der Ergebnisse Hinweise darauf, dass beide Proteine in mehreren Teilbereichen der *H. pylori*-Zellen exprimiert werden, sowohl auf der Oberfläche als auch im Innern (siehe Kapitel 4.1.5). Durch Immunfluoreszenz konnte gezeigt werden, dass beide Proteine zumindest teilweise auf der Bakterienoberfläche lokalisiert sind. Sowohl in permeabilisierten wie auch nicht-permeabilisierten Proben konnten die Fluoreszenzsignale in der Zellperipherie nachgewiesen werden, so wie es für membrangebundene Proteine zu erwarten wäre. Im Zentrum der Bakterienzellen konnte keine Fluoreszenz nachgewiesen werden. Lediglich devitale Bakterienzellen, in denen keine chromosomale DNA mehr nachgewiesen wurde und welche vermutlich lysiert waren, wurden in allen Bakterienkompartimenten mit Fluoreszenzfarbstoff angefärbt. Die überproportionale Stärke des Fluoreszenzsignals sowie das atypische Verteilungsmuster könnten auf eine vermehrte Ansammlung des Fluoreszenzfarbstoffes innerhalb der devitalen Bakterienzellen oder auf eine Kreuzreaktion des Antikörpers mit bakteriellen Abbauprodukten zurückzuführen sein. Diese Beobachtung erfolgte lediglich in vereinzelt Zellen von *H. pylori*. Dadurch konnte jedoch nachgewiesen werden, dass es dem an den Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten Antikörper möglich war, in das Zellinnere der zuvor mit Triton X-100 permeabilisierten Bakterien einzutreten.

Die Auswertung unserer Daten ließ die Vermutung zu, dass CagH und CagL an den Polen von *H. pylori* miteinander interagieren könnten, da es zu einer Überlagerung der

jeweiligen Fluoreszenzsignale kam. An den Seiten der Bakterienzelle hingegen konnten die Proteine zwar stets in räumlicher Nähe, jedoch deutlich voneinander abgegrenzt nachgewiesen werden. Es war uns nicht möglich, durch Immunfluoreszenz und unter Verwendung dieser Bakterienstämme einen separaten intrabakteriellen Pool von CagH oder CagL nachzuweisen. Der Nachweis von CagH und CagL auf der Bakterienoberfläche in der hier vorgelegten Arbeit stimmt mit Ergebnissen aus anderen bereits publizierten Studien überein. In diesen wurde CagL durch elektronenmikroskopische Aufnahmen direkt an der Bakterienoberfläche nachgewiesen. Des Weiteren konnten durch funktionelle Studien eindeutige Hinweise erbracht werden, denen zufolge CagL nicht nur auf der Bakterienoberfläche, sondern an der Pilus-Struktur direkt beteiligt ist (Shaffer et al., 2011). Ein weiterer Hinweis für die Oberflächenexposition von CagL ist dessen Fähigkeit mit Integrinen zu interagieren (Backert et al., 2008; Kwok et al., 2007).

Das sich in unseren Untersuchungen darstellende Verteilungsmuster von CagL auf der Oberfläche von *H. pylori* erinnert an die Ergebnisse zweier von Aguilar et al. publizierter Studien, in welchen durch Dekonvolution fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen ein dreidimensionales Bild erzeugt wurde und anschließend die Lokalisation struktureller Komponenten des T4SS von *A. tumefaciens* analysiert wurden (Aguilar et al., 2011; Aguilar et al., 2010). Es wurden GFP-Fusionsproteine sowohl von Substratproteinen als auch von direkten Komponenten des T4SS konstruiert. Darunter befand sich auch das CagL-Homolog VirB5. Die Daten ließen erkennen, dass die fluoreszenzmarkierten Fusionsproteine gleichermaßen an den Bakterienpolen, wie auch zusätzlich in einem helikalen, periodisch verteilten Muster um die Bakterienzirkumferenz lokalisiert sind. Es wurde nachgewiesen, dass stets multiple T4SS-Zentren exponiert werden. Da Komponenten des bakteriellen Zytoskeletts, wie zum Beispiel das Aktin-Homolog MreBH sowie die Proteine MinD, LytE, SecA und RNaseE, in ähnlicher helikaler Anordnung um die Bakterienzellen verteilt sind, könnte dies ein Hinweis dafür sein, dass solche tieferliegenden Gerüste als Leitstrukturen für die geordnete Expression der T4SS in *H. pylori* und anderen Bakterienzellen dienen

(Campo et al., 2004; Carballido-Lopez et al., 2006; Shih et al., 2003; Shih & Rothfield, 2006; Taghbalout & Rothfield, 2007).

Über die Lokalisation von CagH in der Bakterienzelle ist hingegen bisher wenig bekannt. Durch Sequenzanalysen wurde eine mögliche Transmembran-Domäne identifiziert, über welche das Protein in der inneren Membran verankert wäre (Fischer, 2011; Pham et al., 2012). Eine andere Studie konnte CagH jedoch durch Immunogold-Färbung auf der Bakterienoberfläche nachweisen (Shaffer et al., 2011). Es wurde vermutet, dass CagH ebenfalls direkt an dem Pilus lokalisiert sein könnte. Dieser Hypothese wurde bereits mittels Immunogold-Färbung und anschließender elektronenmikroskopischer Auswertung nachgegangen, jedoch ohne Erfolg (Shaffer et al., 2011). Durch Immunfluoreszenz-Färbung von CagH mittels des fusionierten Epitop-*Tags*, konnte das Protein jedoch in der hier vorgestellten Studie auf der Bakterienoberfläche lokalisiert werden.

5.4 CagH, CagI und CagL bilden Komplexe in *H. pylori*

Die enge Beziehung der drei Proteine konnte in dieser Arbeit durch *tandem-affinity-purification* mittels fusionierter Epitop-*Tags* bestätigt werden. Unsere Daten stimmen in dieser Fragestellung somit mit bereits zuvor publizierten Ergebnissen überein. Im Vergleich zu bisherigen Versuchsansätzen, bei denen jeweils nur ein einzelnes Zielproteine präzipitiert wurde, teilweise mit direkt gegen dieses Protein gerichteten Antiseren, konnten wir durch unsere Vorgehensweise den unspezifischen Hintergrund bei der abschließenden Auswertung durch Immunoblot erfolgreich beseitigen und das Ergebnis damit spezifizieren (Kumar et al., 2013; Pham et al., 2012; Shaffer et al., 2011). Es konnte gezeigt werden, dass CagH, CagI und CagL miteinander interagieren und in *H. pylori* einen Komplex bilden (siehe Kapitel 4.2.2). Dieser nimmt vermutlich eine wichtige Rolle bei der Pilus-Bildung des T4SS ein.

Um noch spezifischere Aussagen über die Komplexbildung und Lokalisation von CagH und CagL in der Bakterienzelle zu treffen, wurden mit Hilfe von Ultrazentrifugation Zellfraktionierungen durchgeführt (siehe Kapitel 4.2.3). Hierdurch konnte

nachgewiesen werden, dass die beiden Proteine in mehreren Bakterienkompartimenten exprimiert werden. Obwohl bereits zuvor durch *tandem-affinity-purification* gezeigt werden konnte, dass CagH und CagL zusammen mit CagI Komplexe bilden, sind die drei Proteine sehr unregelmäßig innerhalb der Bakterienzelle verteilt. Diese Beobachtung stimmt mit den Ergebnissen bereits veröffentlichter Studien überein (Pham et al., 2012; Shaffer et al., 2011). CagH und CagI konnten bei den hier vorgestellten Untersuchungen zu gleichen Teilen in der löslichen sowie unlöslichen Fraktion nachgewiesen werden (Abbildung 4.2.3). Dies stimmt mit den zuvor in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnissen überein, bei welchen CagH durch Immunfluoreszenz auf der Oberfläche von *H. pylori* nachgewiesen wurde. Ein CagH-Pool, der in der löslichen Fraktion vorliegt, widerspricht jedoch einer postulierten N-terminalen Transmembran-Domäne, durch welche das Protein in der Membran verankert wäre. Eine Erklärung hierfür könnte die Ausbildung von Komplexen, in denen sich hydrophobe Proteinbereiche gegenseitig maskieren, sein.

In einer früheren Studie gelang es ebenfalls CagH und CagI, entgegen der Erwartung der Autoren, durch Zellfraktionierung nahezu ausschließlich in der unlöslichen Fraktion nachzuweisen. Sie sahen eine mögliche Erklärung dafür an dem verwendeten Puffer, welchem, genau wie beim hier zugrunde liegenden Versuchsaufbau, kein Detergenz zugesetzt wurde (Shaffer et al., 2011).

CagL hingegen konnte in den hier vorgestellten Untersuchungen fast ausschließlich in der löslichen Fraktion nachgewiesen werden. Da das Protein, genau wie CagI, eine N-terminale Signalsequenz aufweist, handelt es sich hierbei vermutlich um das Periplasma. Da es jedoch gelang, das Protein durch Immunfluoreszenz auf der Bakterienoberfläche zu visualisieren und es auch durch andere Studien Hinweise für eine Oberflächenexponierung gibt, könnte auch eine unvollständige Extraktion von CagL aus der unlöslichen Fraktion durch Verwendung von Triton X-100, welches bevorzugt Proteine aus der inneren Zellmembran löst, zu einem verminderten Nachweis des Proteins in der unlöslichen Fraktion führen (Backert et al., 2008; Kwok et al., 2007; Pattis et al., 2007; Shaffer et al., 2011). Eine ähnliche Problematik wurde bereits bei einer früheren Studie beschrieben, bei welcher CagL nur schwach auf einen

proteolytischen Verdau der Bakterienoberfläche mit Proteinase K ansprach (Pham et al., 2012). Ebenfalls denkbar wäre eine bereits durch Shaffer et al. postulierte Theorie, welcher zufolge die Bindung von CagL an die Bakterienoberfläche so schwach sei, dass sie bereits durch geringe thermische oder mechanische Manipulationen, wie zum Beispiel bei der Ultraschallbehandlung, artifiziell aufgehoben würde und CagL so in Lösung gebracht werden würde (Shaffer et al., 2011). Die in der hier vorliegenden Studie aufgeführten Daten zum Nachweis einer nicht auf der Bakterienoberfläche lokalisierten Ansammlung von CagL stimmen mit den Ergebnissen früherer Studien überein (Kutter et al., 2008; Rohde et al., 2003). Eine Komplexbildung der drei Proteine konnte ebenfalls ausschließlich in der löslichen Fraktion nachgewiesen werden. Ob CagH, CagI und CagL tatsächlich keine Komplexe in der unlöslichen Fraktion der Bakterienzelle bilden, oder ob bei der angewandten Methode die präzipitierte Menge von CagL unterhalb der Nachweisgrenze für einen Immunoblot lag und somit auch keine Komplexbildung nachweisbar war, sollte mit anderen Methoden weiter untersucht werden. Ein möglicher Grund für die variablen Ergebnisse zur Lokalisation der drei Proteine in der Bakterienzelle könnte eine insuffiziente Zellfraktionierung infolge der durchgeführten Ultrazentrifugation sein (siehe Kapitel 3.4.10). So ist es möglich, dass die für die hier vorgestellte Studie gewählten Parameter dazu führten, dass ein Teil der unlöslichen Fraktion noch nicht vollständig sedimentiert wurde, diese Proteine daher immer noch im Überstand in Lösung waren und somit bei der sich anschließenden Analyse der löslichen Fraktion zugeordnet wurden.

5.5 Nachweis funktioneller Domänen von CagH

CagH, CagI und CagL weisen ein gemeinsames C-terminales Sequenzmotiv von sechs Aminosäuren auf. Es konnte nachgewiesen werden, dass durch Deletion des *cagL*- bzw. *cagI*-Sequenzmotivs die Pilus-Produktion komplett ausbleibt und auch keine Translokation von CagA in die Wirtszelle stattfindet. Daher wurde vermutet, dass diese beiden Proteine Bauelemente der Pili seien. Bei Deletion des *cagH*-Sequenzmotivs hingegen konnte eine Pilus-Produktion immer noch nachgewiesen werden, diese erschienen bei elektronenmikroskopischer Auswertung jedoch stark verlängert und

verdickt. Daher wurde vermutet, dass das CagH-Protein eine Art Kontrollfunktion bei dem Zusammenbau des Pilus einnehmen könnte (Shaffer et al., 2011). Neuere Untersuchungen zur Funktionalität der Bakterienzelle geben jedoch Hinweise darauf, dass auch bei Deletion des *cagH*-Sequenzmotivs keine Translokation mehr von CagA in die Wirtszelle stattfindet (E. Weiss und W. Fischer, unveröffentlicht). Mithilfe von Funktions- und Sequenzanalysen konnten bereits wichtige Erkenntnisse über *cagL* gewonnen werden. Innerhalb des Gens konnte ein RGD-Motiv (Arg-Gly-Asp) identifiziert werden (Takagi, 2004). Es konnte nachgewiesen werden, dass durch dieses Motiv die Affinität zu Integrinen erhöht wird (Kwok et al., 2007). Einen Einfluss auf die Funktion des Typ IV-Sekretionssystems hat dieses Motiv jedoch nicht (Jimenez-Soto et al., 2009). Welche funktionellen Domänen möglicherweise innerhalb von *cagH* existieren ist noch wenig erforscht. Es ist bisher z.B. noch nicht geklärt, mithilfe welcher Domänen CagH, CagI und CagL eine Bindung zueinander aufbauen oder, ob interne Sequenzen vorliegen, die nötig sind, um die Proteine in den Pilus einzubauen sowie auf der Oberfläche von *H. pylori* zu exponieren.

Durch frühere Untersuchungen wurde in *cagH* eine Transmembran-Domäne prognostiziert, welche von Position 29 bis 51 vorhergesagt wurde. Die ersten 28 Aminosäuren wurden im Zytoplasma vorhergesagt (Kutter et al., 2008). Durch Zellfraktionierung mittels Ultrazentrifugation und anschließender Auswertung durch Immunoblot konnten in der hier vorliegenden Studie bereits Daten erhoben werden, die dem Vorhandensein einer Transmembran-Domäne in *cagH* widersprechen (siehe Kapitel 5.3). Eine These für die Funktion dieses Genbereichs konnte durch dieses Vorgehen jedoch nicht aufgestellt werden. Daher wurden zur Charakterisierung funktioneller *cagH*-Domänen Mutanten mit definierten N-terminalen Deletionen und fusioniertem Epitop-Tag erzeugt (siehe Kapitel 4.3.1).

Bei Fusion des N-terminalen Endes von CagH mit einem myc-Tag wurde die Translokationseffizienz von CagA in die Wirtszelle um ca. 55 % reduziert. Um herauszufinden, ob eine N-terminale Verkürzung von CagH mit bzw. ohne Deletion der prognostizierten Transmembran-Domäne einen Einfluss auf die Expression des Proteins auf der Bakterienoberfläche sowie auf die Translokation von CagA in die Zielzelle hat,

wurden CagH-Mutanten mit N-terminalen Deletionen und fusioniertem myc-Epitop-Tag generiert. Die anschließende Analyse zeigte, dass sowohl eine Deletion von 26 Aminosäuren, wobei die prognostizierte Transmembran-Domäne bei dieser Mutante intakt blieb, als auch eine Deletion von 52 Aminosäuren, wobei die prognostizierte Transmembran-Domäne somit deletiert wurde, zum Verlust der Translokationsfähigkeit führten (Abbildung 4.3.3). Dadurch konnte nachgewiesen werden, dass der N-Terminus von CagH zu dessen Funktion beiträgt und essentiell für die Translokation von CagA in die Wirtszelle ist.

Als nächster Schritt wurden Experimente zur Bestimmung der Translokationseffizienz von CagA mit myc-CagH-Mutanten mit definierten N-terminalen Deletionen durchgeführt, die zusätzlich Wildtyp-CagH produzierten. Unerwarteterweise wurde lediglich bei der Mutante RNP3 [CagH] [myc-CagH Δ 52N] die Translokationseffizienz wieder auf 100 % hergestellt. Bei der Mutante RNP3 [CagH] [myc-CagH Δ 26N] verblieb die Translokationseffizienz von CagA trotz zusätzlicher Produktion von Wildtyp-CagH bei 0 %. Bei der Mutante RNP3 [CagH] [myc-CagH] betrug die CagA-Translokationseffizienz 60 % (Abbildung 4.3.4). Im Anschluss wurden Immunpräzipitationen zur Untersuchung der Komplexbildung zwischen CagL und CagH mit N-terminalen Deletionen durchgeführt. In vorherigen Experimenten konnte bereits gezeigt werden, dass CagH, CagI und CagL miteinander interagieren und in Immunpräzipitationsexperimenten Komplexe bilden (siehe Kapitel 4.2). Es gelang nachzuweisen, dass in der *H. pylori*-Mutante RNP3 [CagH] [myc-CagH Δ 52N] keine Interaktion zwischen myc-CagH Δ 52N und CagL stattfand (Abbildung 4.3.5). Des Weiteren gelang es nachzuweisen, dass sowohl myc-CagH als auch myc-CagH Δ 26N mit CagL interagieren und Komplexe bilden, obwohl diese zumindest im Falle von myc-CagH Δ 26N nicht funktionell zu sein scheinen, da eine Translokation von CagA in die Zielzelle, wie oben beschrieben, ausblieb. Eine mögliche Erklärung für die in den hier vorgestellten Experimenten unterbliebene Translokation von CagA in die Wirtszelle bei Infektionsexperimenten mit RNP3 [CagH] [myc-CagH Δ 26N], trotz einer erfolgreichen Interaktion mit CagL, könnte somit eine kompetitive Hemmung von CagL durch das verkürzte CagH-Protein myc-CagH Δ 26N sein, wodurch CagL daran

gehindert würde, seine Funktion erfolgreich auszuführen und somit die Translokation von CagA verhindert würde. Ähnliche Beobachtungen wurden auch mit rekombinant in *E. coli* produzierten verkürzten CagH- und CagL-Proteinen gemacht (L. Terradot, Lyon, persönliche Mitteilung).

Als nächstes wurde der Fragestellung nachgegangen, ob der N-Terminus von CagH einen Einfluss auf die Lokalisation des Proteins in der Bakterienzelle hat. Durch Immunfluoreszenz-Färbung von CagH mittels des fusionierten Epitop-*Tags* konnten bereits Hinweise dafür gesammelt werden, dass das Protein teilweise auf der Bakterienoberfläche exponiert wird (siehe Kapitel 4.1.5). Des Weiteren ist es gelungen durch *tandem-affinity-purification* zwei separate CagH-Pools nachzuweisen, einen in der unlöslichen und einen in der löslichen Fraktion (siehe Kapitel 4.2.3). Um den Einfluss der N-terminalen Region und der prognostizierten Transmembran-Domäne auf die Lokalisation von CagH zu untersuchen, wurden Immunfluoreszenz-Färbungen der CagH-Mutanten mit definierten N-terminalen Deletionen und fusioniertem myc-Epitop-*Tag* durchgeführt und anschließend unter dem Konfokalmikroskop analysiert (Abbildung 4.3.6). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass sowohl die alleinige Deletion der N-terminalen Region, als auch eine Deletion von weiteren 26 Aminosäuren, wobei somit zusätzlich die prognostizierte Transmembran-Domäne deletiert wurde, zum Verlust der Exponierung von CagH auf der Bakterienoberfläche führten. In beiden Mutanten konnte durch Permeabilisierung der zu untersuchenden Bakterien das CagH-Protein im Bakterieninnern nachgewiesen werden. In Zusammenschau der Ergebnisse liefern die Daten der hier vorgestellten Studie somit Hinweise dafür, dass die 26 N-terminal gelegenen Aminosäuren von CagH für die Exponierung des Proteins auf der Oberfläche von *H. pylori* notwendig sind. Welche Rolle der N-Terminus bei diesem Prozess genau einnimmt und wie das Protein ohne vorhandene Signalsequenz auf die Bakterienoberfläche gelangt, gilt noch durch weiterführende Studien zu klären. Des Weiteren sind der funktionelle Stellenwert des N-Terminus von CagH für die Translokation von CagA in die Wirtszelle sowie dessen Einfluss auf die Bindung von CagH an seinen Interaktionspartner CagL Ansatzpunkte für weitere Untersuchungen.

6 Fazit und Ausblick

In der hier vorliegenden Studie wurden die auf der *cag*-Pathogenitätsinsel kodierten Proteine CagH und CagL sowie deren Interaktionspartner CagI erforscht, um weitere Einblicke in die komplexe Genese des Typ IV-Sekretionssystems von *H. pylori* und damit einhergehend der Translokation des Onkoproteins CagA in die Wirtszelle zu erlangen. Diese Arbeit stellt eine Methode bereit, CagH und CagL durch Einbringen von Epitop-*Tags* an geeigneten Stellen im Genom in der Bakterienzelle zu lokalisieren. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass CagH und CagL unter anderem auf der Bakterienoberfläche exponiert werden, wo sie häufig in enger räumlicher Nähe zueinander zu finden sind. Es wurde ein interessantes Expressionsmuster von CagL entdeckt. Dieses wird gleichermaßen an den Bakterienpolen wie auch zusätzlich in einem periodisch verteilten, helikalen Muster um die Bakterienzirkumferenz exprimiert. Dies könnte ein Hinweis für eine zugrunde liegende Struktur sein, welche als Leitstruktur für die geordnete Expression der T4SS in *H. pylori* dient. Um weitere Erkenntnisse zu erlangen, wäre es wünschenswert, zusätzlich CagI mit einem Epitop-*Tag* zu fusionieren, um so die Lokalisierung von CagH, CagI und CagL in einer *H. pylori*-Mutante zu ermöglichen. Dies stellt einen Ansatzpunkt für neue Studien bereit. Des Weiteren waren Versuche, CagH und CagL in *cag*-induzierten Bakterienzellen, also sich in direktem Kontakt zu Magenepithelzellen befindenden Bakterien, zu lokalisieren, in welchen der Typ IV-Sekretionsapparat vollständig ausgebildet sein sollte, bisher nicht erfolgreich. Bei Untersuchungen zu der Komplexbildung zwischen CagH, CagI und CagL ist es gelungen, eine Interaktion der drei Proteine ausschließlich in der löslichen Fraktion der Bakterienzelle nachzuweisen. Die genaue Abfolge beim Zusammenbau des Komplexes muss jedoch noch im Detail geklärt und durch weitere Experimente erforscht werden. Die Erkenntnis, dass der N-Terminus von CagH eine Rolle bei der Exponierung des Proteins auf der Bakterienoberfläche, der Translokation von CagA in die Wirtszelle sowie der Interaktion mit CagL spielt, sind weitere wichtige Ergebnisse, die in dieser Studie erlangt wurden. Ob es sich hierbei um ein N-terminales Motiv handelt oder ob allein die

Länge des N-Terminus dafür verantwortlich ist, dass CagH seine Funktionen bei der Genese des Typ IV-Sekretionsapparates erfüllen kann, muss durch weitere Untersuchungen erörtert werden. Dabei könnte der Einfluss der N-terminalen Verkürzung von CagH auf dessen Lokalisation sowie auf die Interaktion mit CagL weiter erforscht werden, indem *H. pylori*-Mutanten erzeugt würden, bei denen zusätzlich CagL mit einem Epitop-*Tag* fusioniert würde.

7 Literaturverzeichnis

- Aguilar, J., Cameron, T. A., Zupan, J., & Zambryski, P. (2011). Membrane and core periplasmic *Agrobacterium tumefaciens* virulence Type IV secretion system components localize to multiple sites around the bacterial perimeter during lateral attachment to plant cells. *MBio*, 2(6), e00218-00211. doi:10.1128/mBio.00218-11
- Aguilar, J., Zupan, J., Cameron, T. A., & Zambryski, P. C. (2010). *Agrobacterium* type IV secretion system and its substrates form helical arrays around the circumference of virulence-induced cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(8), 3758-3763. doi:10.1073/pnas.0914940107
- Aly, K. A., & Baron, C. (2007). The VirB5 protein localizes to the T-pilus tips in *Agrobacterium tumefaciens*. *Microbiology*, 153(Pt 11), 3766-3775. doi:10.1099/mic.0.2007/010462-0
- Amieva, & Peek, R. M., Jr. (2016). Pathobiology of *Helicobacter pylori*-Induced Gastric Cancer. *Gastroenterology*, 150(1), 64-78. doi:10.1053/j.gastro.2015.09.004
- Amieva, M. R., Vogelmann, R., Covacci, A., Tompkins, L. S., Nelson, W. J., & Falkow, S. (2003). Disruption of the epithelial apical-junctional complex by *Helicobacter pylori* CagA. *Science*, 300(5624), 1430-1434. doi:10.1126/science.1081919
- Andrzejewska, J., Lee, S. K., Olbermann, P., Lotzing, N., Katzowitsch, E., Linz, B., Achtman, M., Kado, C. I., Suerbaum, S., & Josenhans, C. (2006). Characterization of the pilin ortholog of the *Helicobacter pylori* type IV cag pathogenicity apparatus, a surface-associated protein expressed during infection. *J Bacteriol*, 188(16), 5865-5877. doi:10.1128/JB.00060-06
- Atherton, J. C. (2006). The pathogenesis of *Helicobacter pylori*-induced gastro-duodenal diseases. *Annu Rev Pathol*, 1, 63-96. doi:10.1146/annurev.pathol.1.110304.100125
- Atherton, J. C., & Blaser, M. J. (2009). Coadaptation of *Helicobacter pylori* and humans: ancient history, modern implications. *J Clin Invest*, 119(9), 2475-2487. doi:10.1172/jci38605
- Backert, S., Clyne, M., & Tegtmeyer, N. (2011). Molecular mechanisms of gastric epithelial cell adhesion and injection of CagA by *Helicobacter pylori*. *Cell Commun Signal*, 9, 28. doi:10.1186/1478-811x-9-28
- Backert, S., Fronzes, R., & Waksman, G. (2008). VirB2 and VirB5 proteins: specialized adhesins in bacterial type-IV secretion systems? *Trends Microbiol*, 16(9), 409-413. doi:10.1016/j.tim.2008.07.001
- Backert, S., Tegtmeyer, N., & Fischer, W. (2015). Composition, structure and function of the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island encoded type IV secretion system. *Future Microbiol*, 10(6), 955-965. doi:10.2217/fmb.15.32
- Barden, S., Lange, S., Tegtmeyer, N., Conradi, J., Sewald, N., Backert, S., & Niemann, H. H. (2013). A helical RGD motif promoting cell adhesion: crystal structures of the *Helicobacter pylori* type IV secretion system pilus protein CagL. *Structure*, 21(11), 1931-1941. doi:10.1016/j.str.2013.08.018

- Barden, S., & Niemann, H. H. (2015). Adhesion of several cell lines to *Helicobacter pylori* CagL is mediated by integrin α V β 6 via an RGD β XXL motif. *J Mol Biol*, 427(6 Pt B), 1304-1315. doi:10.1016/j.jmb.2015.01.006
- Barden, S., Schomburg, B., Conradi, J., Backert, S., Sewald, N., & Niemann, H. H. (2014). Structure of a three-dimensional domain-swapped dimer of the *Helicobacter pylori* type IV secretion system pilus protein CagL. *Acta Crystallographica Section D*, 70(5), 1391-1400. doi:10.1107/S1399004714003150
- Belogolova, E., Bauer, B., Pompaiah, M., Asakura, H., Brinkman, V., Ertl, C., Bartfeld, S., Nechitaylo, T. Y., Haas, R., Machuy, N., Salama, N., Churin, Y., & Meyer, T. F. (2013). *Helicobacter pylori* outer membrane protein HopQ identified as a novel T4SS-associated virulence factor. *Cell Microbiol*, 15(11), 1896-1912. doi:10.1111/cmi.12158
- Berger, K. H., & Isberg, R. R. (1993). Two distinct defects in intracellular growth complemented by a single genetic locus in *Legionella pneumophila*. *Mol Microbiol*, 7(1), 7-19.
- Blaser, M. J., Nomura, A., Lee, J., Stemmerman, G. N., & Perez-Perez, G. I. (2007). Early-life family structure and microbially induced cancer risk. *PLoS Med*, 4(1), e7. doi:10.1371/journal.pmed.0040007
- Bonsor, D. A., Pham, K. T., Beadenkopf, R., Diederichs, K., Haas, R., Beckett, D., Fischer, W., & Sundberg, E. J. (2015). Integrin engagement by the helical RGD motif of the *Helicobacter pylori* CagL protein is regulated by pH-induced displacement of a neighboring helix. *J Biol Chem*, 290(20), 12929-12940. doi:10.1074/jbc.M115.641829
- Bonsor, D. A., Zhao, Q., Schmidinger, B., Weiss, E., Wang, J., Deredge, D., Beadenkopf, R., Dow, B., Fischer, W., Beckett, D., Wintrobe, P. L., Haas, R., & Sundberg, E. J. (2018). The *Helicobacter pylori* adhesin protein HopQ exploits the dimer interface of human CEACAMs to facilitate translocation of the oncoprotein CagA. *Embo j*, 37(13). doi:10.15252/embj.201798664
- Breckan, R. K., Paulssen, E. J., Asfeldt, A. M., Kvamme, J. M., Straume, B., & Florholmen, J. (2016). The All-Age Prevalence of *Helicobacter pylori* Infection and Potential Transmission Routes. A Population-Based Study. *Helicobacter*, 21(6), 586-595. doi:10.1111/hel.12316
- Campo, N., Tjalsma, H., Buist, G., Stepniak, D., Meijer, M., Veenhuis, M., Westermann, M., Müller, J. P., Bron, S., Kok, J., Kuipers, O. P., & Jongbloed, J. D. (2004). Subcellular sites for bacterial protein export. *Mol Microbiol*, 53(6), 1583-1599. doi:10.1111/j.1365-2958.2004.04278.x
- Carballido-Lopez, R., Formstone, A., Li, Y., Ehrlich, S. D., Noirot, P., & Errington, J. (2006). Actin homolog MreBH governs cell morphogenesis by localization of the cell wall hydrolase LytE. *Dev Cell*, 11(3), 399-409. doi:10.1016/j.devcel.2006.07.017
- Cascales, E., & Christie, P. J. (2003). The versatile bacterial type IV secretion systems. *Nat Rev Microbiol*, 1(2), 137-149. doi:10.1038/nrmicro753
- Celli, J. P., Turner, B. S., Afdhal, N. H., Keates, S., Ghiran, I., Kelly, C. P., Ewoldt, R. H., McKinley, G. H., So, P., Erramilli, S., & Bansil, R. (2009). *Helicobacter*

- pylori moves through mucus by reducing mucin viscoelasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(34), 14321-14326. doi:10.1073/pnas.0903438106
- Chen, J., Gong, T. T., & Wu, Q. J. (2016). Parity and gastric cancer risk: a systematic review and dose-response meta-analysis of prospective cohort studies. *Sci Rep*, 6, 18766. doi:10.1038/srep18766
- Choi, J. M., Choi, Y. H., Sudhanva, M. S., Devakumar, S., Lee, K. H., Cha, J. H., & Lee, S. H. (2015). Crystal structure of CagL from *Helicobacter pylori* K74 strain. *Biochem Biophys Res Commun*, 460(4), 964-970. doi:10.1016/j.bbrc.2015.03.135
- Christie, P. J. (1997). *Agrobacterium tumefaciens* T-complex transport apparatus: a paradigm for a new family of multifunctional transporters in eubacteria. *J Bacteriol*, 179(10), 3085-3094.
- Christie, P. J. (2004). Type IV secretion: the *Agrobacterium* VirB/D4 and related conjugation systems. *Biochim Biophys Acta*, 1694(1-3), 219-234. doi:10.1016/j.bbamcr.2004.02.013
- Conradi, J., Tegtmeyer, N., Wozna, M., Wissbrock, M., Michalek, C., Gagell, C., Cover, T. L., Frank, R., Sewald, N., & Backert, S. (2012). An RGD helper sequence in CagL of *Helicobacter pylori* assists in interactions with integrins and injection of CagA. *Front Cell Infect Microbiol*, 2, 70. doi:10.3389/fcimb.2012.00070
- Couturier, M. R., Tasca, E., Montecucco, C., & Stein, M. (2006). Interaction with CagF is required for translocation of CagA into the host via the *Helicobacter pylori* type IV secretion system. *Infect Immun*, 74(1), 273-281. doi:10.1128/iai.74.1.273-281.2006
- Covacci, A., Telford, J. L., Del Giudice, G., Parsonnet, J., & Rappuoli, R. (1999). *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography. *Science*, 284(5418), 1328-1333.
- Eisenbrandt, R., Kalkum, M., Lai, E. M., Lurz, R., Kado, C. I., & Lanka, E. (1999). Conjugative pili of IncP plasmids, and the Ti plasmid T pilus are composed of cyclic subunits. *J Biol Chem*, 274(32), 22548-22555.
- El-Omar, E. M., Ng, M. T., & Hold, G. L. (2008). Polymorphisms in Toll-like receptor genes and risk of cancer. *Oncogene*, 27(2), 244-252. doi:10.1038/sj.onc.1210912
- Fang, X., Wei, J., He, X., An, P., Wang, H., Jiang, L., Shao, D., Liang, H., Li, Y., Wang, F., & Min, J. (2015). Landscape of dietary factors associated with risk of gastric cancer: A systematic review and dose-response meta-analysis of prospective cohort studies. *Eur J Cancer*, 51(18), 2820-2832. doi:10.1016/j.ejca.2015.09.010
- Fischer, W. (2011). Assembly and molecular mode of action of the *Helicobacter pylori* Cag type IV secretion apparatus. *Febs j*, 278(8), 1203-1212. doi:10.1111/j.1742-4658.2011.08036.x
- Foegeding, N. J., Caston, R. R., McClain, M. S., Ohi, M. D., & Cover, T. L. (2016). An Overview of *Helicobacter pylori* VacA Toxin Biology. *Toxins (Basel)*, 8(6). doi:10.3390/toxins8060173
- Frick-Cheng, A. E., Pyburn, T. M., Voss, B. J., McDonald, W. H., Ohi, M. D., & Cover, T. L. (2016). Molecular and Structural Analysis of the *Helicobacter pylori* cag

- Type IV Secretion System Core Complex. *MBio*, 7(1), e02001-02015. doi:10.1128/mBio.02001-15
- Fullner, K. J., Lara, J. C., & Nester, E. W. (1996). Pilus assembly by *Agrobacterium* T-DNA transfer genes. *Science*, 273(5278), 1107-1109.
- Gaddy, J. A., Radin, J. N., Loh, J. T., Piazzuelo, M. B., Kehl-Fie, T. E., Delgado, A. G., Ilca, F. T., Peek, R. M., Cover, T. L., Chazin, W. J., Skaar, E. P., & Scott Algood, H. M. (2014). The host protein calprotectin modulates the *Helicobacter pylori* cag type IV secretion system via zinc sequestration. *PLoS Pathog*, 10(10), e1004450. doi:10.1371/journal.ppat.1004450
- Gall, A., Gaudet, R. G., Gray-Owen, S. D., & Salama, N. R. (2017). TIFA Signaling in Gastric Epithelial Cells Initiates the cag Type 4 Secretion System-Dependent Innate Immune Response to *Helicobacter pylori* Infection. *MBio*, 8(4). doi:10.1128/mBio.01168-17
- Gebert, B., Fischer, W., Weiss, E., Hoffmann, R., & Haas, R. (2003). *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin inhibits T lymphocyte activation. *Science*, 301(5636), 1099-1102. doi:10.1126/science.1086871
- Gorman, J. J., & Folk, J. E. (1981). Structural features of glutamine substrates for transglutaminases. Specificities of human plasma factor XIIIa and the guinea pig liver enzyme toward synthetic peptides. *J Biol Chem*, 256(6), 2712-2715.
- Haley, K. P., Blanz, E. J., & Gaddy, J. A. (2014). High resolution electron microscopy of the *Helicobacter pylori* Cag type IV secretion system pili produced in varying conditions of iron availability. *J Vis Exp*(93), e52122. doi:10.3791/52122
- Hapfelmeier, S., Domke, N., Zambryski, P. C., & Baron, C. (2000). VirB6 is required for stabilization of VirB5 and VirB3 and formation of VirB7 homodimers in *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol*, 182(16), 4505-4511.
- Hare, S., Fischer, W., Williams, R., Terradot, L., Bayliss, R., Haas, R., & Waksman, G. (2007). Identification, structure and mode of action of a new regulator of the *Helicobacter pylori* HP0525 ATPase. *Embo j*, 26(23), 4926-4934. doi:10.1038/sj.emboj.7601904
- Hospenthal, M. K., Costa, T. R. D., & Waksman, G. (2017). A comprehensive guide to pilus biogenesis in Gram-negative bacteria. *Nat Rev Microbiol*, 15(6), 365-379. doi:10.1038/nrmicro.2017.40
- Huang, J. Y., Sweeney, E. G., Sigal, M., Zhang, H. C., Remington, S. J., Cantrell, M. A., Kuo, C. J., Guillemin, K., & Amieva, M. R. (2015). Chemodetection and Destruction of Host Urea Allows *Helicobacter pylori* to Locate the Epithelium. *Cell Host Microbe*, 18(2), 147-156. doi:10.1016/j.chom.2015.07.002
- Ilver, D., Arnqvist, A., Ogren, J., Frick, I. M., Kersulyte, D., Incecik, E. T., Berg, D. E., Covacci, A., Engstrand, L., & Boren, T. (1998). *Helicobacter pylori* adhesin binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging. *Science*, 279(5349), 373-377.
- Javaheri, A., Kruse, T., Moonens, K., Mejias-Luque, R., Debraekeleer, A., Asche, C. I., Tegtmeyer, N., Kalali, B., Bach, N. C., Sieber, S. A., Hill, D. J., Königer, V., Hauck, C. R., Moskalenko, R., Haas, R., Busch, D. H., Klaile, E., Slevogt, H., Schmidt, A., Backert, S., Remaut, H., Singer, B. B., & Gerhard, M. (2016). *Helicobacter pylori* adhesin HopQ engages in a virulence-enhancing interaction

- with human CEACAMs. *Nat Microbiol*, 2, 16189. doi:10.1038/nmicrobiol.2016.189
- Jimenez-Soto, L. F., Kutter, S., Sewald, X., Ertl, C., Weiss, E., Kapp, U., Rohde, M., Pirch, T., Jung, K., Retta, S. F., Terradot, L., Fischer, W., & Haas, R. (2009). Helicobacter pylori type IV secretion apparatus exploits beta1 integrin in a novel RGD-independent manner. *PLoS Pathog*, 5(12), e1000684. doi:10.1371/journal.ppat.1000684
- Johnson, E. M., Gaddy, J. A., Voss, B. J., Hennig, E. E., & Cover, T. L. (2014). Genes required for assembly of pili associated with the Helicobacter pylori cag type IV secretion system. *Infect Immun*, 82(8), 3457-3470. doi:10.1128/iai.01640-14
- Junaid, M., Linn, A. K., Javadi, M. B., Al-Gubare, S., Ali, N., & Katzenmeier, G. (2016). Vacuolating cytotoxin A (VacA) - A multi-talented pore-forming toxin from Helicobacter pylori. *Toxicon*, 118, 27-35. doi:10.1016/j.toxicon.2016.04.037
- Jurik, A., Hausser, E., Kutter, S., Pattis, I., Prassl, S., Weiss, E., & Fischer, W. (2010). The coupling protein Cagbeta and its interaction partner CagZ are required for type IV secretion of the Helicobacter pylori CagA protein. *Infect Immun*, 78(12), 5244-5251. doi:10.1128/iai.00796-10
- Kim, I. J., & Blanke, S. R. (2012). Remodeling the host environment: modulation of the gastric epithelium by the Helicobacter pylori vacuolating toxin (VacA). *Front Cell Infect Microbiol*, 2, 37. doi:10.3389/fcimb.2012.00037
- Koelblen, T., Berge, C., Cherrier, M. V., Brillet, K., Jimenez-Soto, L., Ballut, L., Takagi, J., Montserret, R., Rousselle, P., Fischer, W., Haas, R., Fronzes, R., & Terradot, L. (2017). Molecular dissection of protein-protein interactions between integrin alpha5beta1 and the Helicobacter pylori Cag type IV secretion system. *Febs j*, 284(23), 4143-4157. doi:10.1111/febs.14299
- Königer, V., Holsten, L., Harrison, U., Busch, B., Loell, E., Zhao, Q., Bonsor, D. A., Roth, A., Kengmo-Tchoupa, A., Smith, S. I., Müller, S., Sundberg, E. J., Zimmermann, W., Fischer, W., Hauck, C. R., & Haas, R. (2016). Helicobacter pylori exploits human CEACAMs via HopQ for adherence and translocation of CagA. *Nat Microbiol*, 2, 16188. doi:10.1038/nmicrobiol.2016.188
- Krall, L., Wiedemann, U., Unsin, G., Weiss, S., Domke, N., & Baron, C. (2002). Detergent extraction identifies different VirB protein subassemblies of the type IV secretion machinery in the membranes of Agrobacterium tumefaciens. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(17), 11405-11410. doi:10.1073/pnas.172390699
- Kumar, N., Shariq, M., Kumari, R., Tyagi, R. K., & Mukhopadhyay, G. (2013). Cag type IV secretion system: CagI independent bacterial surface localization of CagA. *PLoS One*, 8(9), e74620-e74620. doi:10.1371/journal.pone.0074620
- Kutter, S., Buhrdorf, R., Haas, J., Schneider-Brachert, W., Haas, R., & Fischer, W. (2008). Protein subassemblies of the Helicobacter pylori Cag type IV secretion system revealed by localization and interaction studies. *J Bacteriol*, 190(6), 2161-2171. doi:10.1128/jb.01341-07
- Kwok, T., Zabler, D., Urman, S., Rohde, M., Hartig, R., Wessler, S., Misselwitz, R., Berger, J., Sewald, N., König, W., & Backert, S. (2007). Helicobacter exploits integrin for type IV secretion and kinase activation. *Nature*, 449(7164), 862-866. doi:10.1038/nature06187

- Lai, E. M., Eisenbrandt, R., Kalkum, M., Lanka, E., & Kado, C. I. (2002). Biogenesis of T pili in *Agrobacterium tumefaciens* requires precise VirB2 propilin cleavage and cyclization. *J Bacteriol*, *184*(1), 327-330.
- Lai, E. M., & Kado, C. I. (1998). Processed VirB2 is the major subunit of the promiscuous pilus of *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol*, *180*(10), 2711-2717.
- Leunk, R. D., Johnson, P. T., David, B. C., Kraft, W. G., & Morgan, D. R. (1988). Cytotoxic activity in broth-culture filtrates of *Campylobacter pylori*. *J Med Microbiol*, *26*(2), 93-99. doi:10.1099/00222615-26-2-93
- Li, L. F., Chan, R. L., Lu, L., Shen, J., Zhang, L., Wu, W. K., Wang, L., Hu, T., Li, M. X., & Cho, C. H. (2014). Cigarette smoking and gastrointestinal diseases: the causal relationship and underlying molecular mechanisms (review). *Int J Mol Med*, *34*(2), 372-380. doi:10.3892/ijmm.2014.1786
- Lin, C. W., & Ting, A. Y. (2006). Transglutaminase-catalyzed site-specific conjugation of small-molecule probes to proteins in vitro and on the surface of living cells. *J Am Chem Soc*, *128*(14), 4542-4543. doi:10.1021/ja0604111
- Loh, J. T., Gaddy, J. A., Algood, H. M., Gaudieri, S., Mallal, S., & Cover, T. L. (2015). *Helicobacter pylori* adaptation in vivo in response to a high-salt diet. *Infect Immun*, *83*(12), 4871-4883. doi:10.1128/iai.00918-15
- Luo, B. H., Carman, C. V., & Springer, T. A. (2007). Structural basis of integrin regulation and signaling. *Annu Rev Immunol*, *25*, 619-647. doi:10.1146/annurev.immunol.25.022106.141618
- Mahdavi, J., Sonden, B., Hurtig, M., Olfat, F. O., Forsberg, L., Roche, N., Angstrom, J., Larsson, T., Teneberg, S., Karlsson, K. A., Altraja, S., Wadstrom, T., Kersulyte, D., Berg, D. E., Dubois, A., Petersson, C., Magnusson, K. E., Norberg, T., Lindh, F., Lundskog, B. B., Arnqvist, A., Hammarstrom, L., & Boren, T. (2002). *Helicobacter pylori* SabA adhesin in persistent infection and chronic inflammation. *Science*, *297*(5581), 573-578. doi:10.1126/science.1069076
- Malfertheiner, P., Megraud, F., O'Morain, C. A., Gisbert, J. P., Kuipers, E. J., Axon, A. T., Bazzoli, F., Gasbarrini, A., Atherton, J., Graham, D. Y., Hunt, R., Moayyedi, P., Rokkas, T., Rugge, M., Selgrad, M., Suerbaum, S., Sugano, K., & El-Omar, E. M. (2017). Management of *Helicobacter pylori* infection-the Maastricht V/Florence Consensus Report. *Gut*, *66*(1), 6-30. doi:10.1136/gutjnl-2016-312288
- Marshall, B. J., & Warren, J. R. (1984). Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet*, *i*(8390), 1311-1315.
- Müller, D., Tegtmeyer, N., Brandt, S., Yamaoka, Y., De Poire, E., Sgouras, D., Wessler, S., Torres, J., Smolka, A., & Backert, S. (2012). c-Src and c-Abl kinases control hierarchic phosphorylation and function of the CagA effector protein in Western and East Asian *Helicobacter pylori* strains. *J Clin Invest*, *122*(4), 1553-1566. doi:10.1172/jci61143
- Noto, J. M., Gaddy, J. A., Lee, J. Y., Piazzuelo, M. B., Friedman, D. B., Colvin, D. C., Romero-Gallo, J., Suarez, G., Loh, J., Slaughter, J. C., Tan, S., Morgan, D. R., Wilson, K. T., Bravo, L. E., Correa, P., Cover, T. L., Amieva, M. R., & Peek, R. M., Jr. (2013). Iron deficiency accelerates *Helicobacter pylori*-induced

- carcinogenesis in rodents and humans. *J Clin Invest*, 123(1), 479-492. doi:10.1172/jci64373
- Obert, S., O'Connor, R. J., Schmid, S., & Hearing, P. (1994). The adenovirus E4-6/7 protein transactivates the E2 promoter by inducing dimerization of a heteromeric E2F complex. *Mol Cell Biol*, 14(2), 1333-1346.
- Odenbreit, S., Püls, J., Sedlmaier, B., Gerland, E., Fischer, W., & Haas, R. (2000). Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion. *Science*, 287(5457), 1497-1500.
- Odenbreit, S., Swoboda, K., Barwig, I., Ruhl, S., Boren, T., Koletzko, S., & Haas, R. (2009). Outer membrane protein expression profile in *Helicobacter pylori* clinical isolates. *Infect Immun*, 77(9), 3782-3790. doi:10.1128/iai.00364-09
- Ordóñez-Mena, J. M., Schottker, B., Mons, U., Jenab, M., Freisling, H., Bueno-de-Mesquita, B., O'Doherty, M. G., Scott, A., Kee, F., Stricker, B. H., Hofman, A., de Keyser, C. E., Ruiter, R., Soderberg, S., Jousilahti, P., Kuulasmaa, K., Freedman, N. D., Wilsgaard, T., de Groot, L. C., Kampman, E., Hakansson, N., Orsini, N., Wolk, A., Nilsson, L. M., Tjonneland, A., Pajak, A., Malyutina, S., Kubinova, R., Tamosiunas, A., Bobak, M., Katsoulis, M., Orfanos, P., Boffetta, P., Trichopoulou, A., & Brenner, H. (2016). Quantification of the smoking-associated cancer risk with rate advancement periods: meta-analysis of individual participant data from cohorts of the CHANCES consortium. *BMC Med*, 14, 62. doi:10.1186/s12916-016-0607-5
- Parsonnet, J., Friedman, G. D., Orentreich, N., & Vogelman, H. (1997). Risk for gastric cancer in people with CagA positive or CagA negative *Helicobacter pylori* infection. *Gut*, 40(3), 297-301.
- Pattis, I., Weiss, E., Laugks, R., Haas, R., & Fischer, W. (2007). The *Helicobacter pylori* CagF protein is a type IV secretion chaperone-like molecule that binds close to the C-terminal secretion signal of the CagA effector protein. *Microbiology*, 153(Pt 9), 2896-2909. doi:10.1099/mic.0.2007/007385-0
- Pham, K. T., Weiss, E., Jimenez Soto, L. F., Breithaupt, U., Haas, R., & Fischer, W. (2012). CagI is an essential component of the *Helicobacter pylori* Cag type IV secretion system and forms a complex with CagL. *PLoS One*, 7(4), e35341. doi:10.1371/journal.pone.0035341
- Pinto-Santini, D. M., & Salama, N. R. (2009). Cag3 is a novel essential component of the *Helicobacter pylori* Cag type IV secretion system outer membrane subcomplex. *J Bacteriol*, 191(23), 7343-7352. doi:10.1128/jb.00946-09
- Ramsey, M. E., Woodhams, K. L., & Dillard, J. P. (2011). The Gonococcal Genetic Island and Type IV Secretion in the Pathogenic *Neisseria*. *Front Microbiol*, 2, 61. doi:10.3389/fmicb.2011.00061
- Rohde, M., Püls, J., Buhrdorf, R., Fischer, W., & Haas, R. (2003). A novel sheathed surface organelle of the *Helicobacter pylori* cag type IV secretion system. *Mol Microbiol*, 49(1), 219-234.
- Sadosky, A. B., Wiater, L. A., & Shuman, H. A. (1993). Identification of *Legionella pneumophila* genes required for growth within and killing of human macrophages. *Infect Immun*, 61(12), 5361-5373.
- Schindele, F., Weiss, E., Haas, R., & Fischer, W. (2016). Quantitative analysis of CagA type IV secretion by *Helicobacter pylori* reveals substrate recognition and

- translocation requirements. *Mol Microbiol*, 100(1), 188-203. doi:10.1111/mmi.13309
- Schmidt-Eisenlohr, H., Domke, N., Angerer, C., Wanner, G., Zambryski, P. C., & Baron, C. (1999). Vir proteins stabilize VirB5 and mediate its association with the T pilus of *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol*, 181(24), 7485-7492.
- Schmitt, W., & Haas, R. (1994). Genetic analysis of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin: structural similarities with the IgA protease type of exported protein. *Mol Microbiol*, 12(2), 307-319.
- Segal, E. D., Cha, J., Lo, J., Falkow, S., & Tompkins, L. S. (1999). Altered states: involvement of phosphorylated CagA in the induction of host cellular growth changes by *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(25), 14559-14564.
- Selbach, M., Paul, F. E., Brandt, S., Guye, P., Daumke, O., Backert, S., Dehio, C., & Mann, M. (2009). Host cell interactome of tyrosine-phosphorylated bacterial proteins. *Cell Host Microbe*, 5(4), 397-403. doi:10.1016/j.chom.2009.03.004
- Shaffer, C. L., Gaddy, J. A., Loh, J. T., Johnson, E. M., Hill, S., Hennig, E. E., McClain, M. S., McDonald, W. H., & Cover, T. L. (2011). *Helicobacter pylori* exploits a unique repertoire of type IV secretion system components for pilus assembly at the bacteria-host cell interface. *PLoS Pathog*, 7(9), e1002237. doi:10.1371/journal.ppat.1002237
- Shih, Y. L., Le, T., & Rothfield, L. (2003). Division site selection in *Escherichia coli* involves dynamic redistribution of Min proteins within coiled structures that extend between the two cell poles. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(13), 7865-7870. doi:10.1073/pnas.1232225100
- Shih, Y. L., & Rothfield, L. (2006). The bacterial cytoskeleton. *Microbiol Mol Biol Rev*, 70(3), 729-754. doi:10.1128/mmbr.00017-06
- Smith, K. S., & Ferry, J. G. (2000). Prokaryotic carbonic anhydrases. *FEMS Microbiol Rev*, 24(4), 335-366.
- Stein, S. C., Faber, E., Bats, S. H., Murillo, T., Speidel, Y., Coombs, N., & Josenhans, C. (2017). *Helicobacter pylori* modulates host cell responses by CagT4SS-dependent translocation of an intermediate metabolite of LPS inner core heptose biosynthesis. *PLoS Pathog*, 13(7), e1006514. doi:10.1371/journal.ppat.1006514
- Stingl, K., Müller, S., Scheidgen-Kleyboldt, G., Clausen, M., & Maier, B. (2010). Composite system mediates two-step DNA uptake into *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(3), 1184-1189. doi:10.1073/pnas.0909955107
- Taghbalout, A., & Rothfield, L. (2007). RNaseE and the other constituents of the RNA degradosome are components of the bacterial cytoskeleton. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(5), 1667-1672. doi:10.1073/pnas.0610491104
- Takagi, J. (2004). Structural basis for ligand recognition by RGD (Arg-Gly-Asp)-dependent integrins. *Biochem Soc Trans*, 32(Pt3), 403-406. doi:10.1042/bst0320403
- Tanaka, J., Suzuki, T., Mimuro, H., & Sasakawa, C. (2003). Structural definition on the surface of *Helicobacter pylori* type IV secretion apparatus. *Cell Microbiol*, 5(6), 395-404.

- Tegtmeyer, N., Wessler, S., & Backert, S. (2011). Role of the cag-pathogenicity island encoded type IV secretion system in *Helicobacter pylori* pathogenesis. *Febs j*, 278(8), 1190-1202. doi:10.1111/j.1742-4658.2011.08035.x
- Terebiznik, M. R., Raju, D., Vazquez, C. L., Torbricki, K., Kulkarni, R., Blanke, S. R., Yoshimori, T., Colombo, M. I., & Jones, N. L. (2009). Effect of *Helicobacter pylori*'s vacuolating cytotoxin on the autophagy pathway in gastric epithelial cells. *Autophagy*, 5(3), 370-379.
- Ubukata, H., Nagata, H., Tabuchi, T., Konishi, S., Kasuga, T., & Tabuchi, T. (2011). Why is the coexistence of gastric cancer and duodenal ulcer rare? Examination of factors related to both gastric cancer and duodenal ulcer. *Gastric Cancer*, 14(1), 4-12. doi:10.1007/s10120-011-0005-9
- Varga, M. G., Shaffer, C. L., Sierra, J. C., Suarez, G., Piazuelo, M. B., Whitaker, M. E., Romero-Gallo, J., Krishna, U. S., Delgado, A., Gomez, M. A., Good, J. A., Almqvist, F., Skaar, E. P., Correa, P., Wilson, K. T., Hadjifrangiskou, M., & Peek, R. M. (2016). Pathogenic *Helicobacter pylori* strains translocate DNA and activate TLR9 via the cancer-associated cag type IV secretion system. *Oncogene*, 35(48), 6262-6269. doi:10.1038/onc.2016.158
- Viala, J., Chaput, C., Boneca, I. G., Cardona, A., Girardin, S. E., Moran, A. P., Athman, R., Memet, S., Huerre, M. R., Coyle, A. J., DiStefano, P. S., Sansonetti, P. J., Labigne, A., Bertin, J., Philpott, D. J., & Ferrero, R. L. (2004). Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island. *Nat Immunol*, 5(11), 1166-1174. doi:10.1038/ni1131
- Warren, J. R., & Marshall, B. (1983). Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet*, 1(8336), 1273-1275.
- Weeks, D. L., Eskandari, S., Scott, D. R., & Sachs, G. (2000). A H⁺-gated urea channel: the link between *Helicobacter pylori* urease and gastric colonization. *Science*, 287(5452), 482-485.
- Wiedemann, T., Hofbaur, S., Tegtmeyer, N., Huber, S., Sewald, N., Wessler, S., Backert, S., & Rieder, G. (2012). *Helicobacter pylori* CagL dependent induction of gastrin expression via a novel alphavbeta5-integrin-integrin linked kinase signalling complex. *Gut*, 61(7), 986-996. doi:10.1136/gutjnl-2011-300525
- Yamaoka, Y., & Graham, D. Y. (2014). *Helicobacter pylori* virulence and cancer pathogenesis. *Future Oncol*, 10(8), 1487-1500. doi:10.2217/fon.14.29
- Yamaoka, Y., Ojo, O., Fujimoto, S., Odenbreit, S., Haas, R., Gutierrez, O., El-Zimaity, H. M., Reddy, R., Arnqvist, A., & Graham, D. Y. (2006). *Helicobacter pylori* outer membrane proteins and gastroduodenal disease. *Gut*, 55(6), 775-781. doi:10.1136/gut.2005.083014
- Yeo, H. J., Yuan, Q., Beck, M. R., Baron, C., & Waksman, G. (2003). Structural and functional characterization of the VirB5 protein from the type IV secretion system encoded by the conjugative plasmid pKM101. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(26), 15947-15952. doi:10.1073/pnas.2535211100
- Yoshiyama, H., & Nakazawa, T. (2000). Unique mechanism of *Helicobacter pylori* for colonizing the gastric mucus. *Microbes Infect*, 2(1), 55-60.
- Zhao, Q., Busch, B., Jimenez-Soto, L. F., Ishikawa-Ankerhold, H., Massberg, S., Terradot, L., Fischer, W., & Haas, R. (2018). Integrin but not CEACAM

- receptors are dispensable for *Helicobacter pylori* CagA translocation. *PLoS Pathog*, 14(10), e1007359. doi:10.1371/journal.ppat.1007359
- Zhou, P., She, Y., Dong, N., Li, P., He, H., Borio, A., Wu, Q., Lu, S., Ding, X., Cao, Y., Xu, Y., Gao, W., Dong, M., Ding, J., Wang, D. C., Zamyatina, A., & Shao, F. (2018). Alpha-kinase 1 is a cytosolic innate immune receptor for bacterial ADP-heptose. *Nature*, 561(7721), 122-126. doi:10.1038/s41586-018-0433-3
- Zimmermann, S., Pfannkuch, L., Al-Zeer, M. A., Bartfeld, S., Koch, M., Liu, J., Rechner, C., Soerensen, M., Sokolova, O., Zamyatina, A., Kosma, P., Maurer, A. P., Glowinski, F., Pleissner, K. P., Schmid, M., Brinkmann, V., Karlas, A., Naumann, M., Rother, M., Machuy, N., & Meyer, T. F. (2017). ALPK1- and TIFA-Dependent Innate Immune Response Triggered by the *Helicobacter pylori* Type IV Secretion System. *Cell Rep*, 20(10), 2384-2395. doi:10.1016/j.celrep.2017.08.039

8 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater PD Dr. Wolfgang Fischer, für die herzliche Aufnahme am Max von Pettenkofer-Institut und die Bereitstellung des Themas dieser Arbeit. Ebenso möchte ich ihm danken für die ausgezeichnete Einarbeitung im Labor, die hervorragende Betreuung bis zum letzten Tag und die hilfreichen Anregungen bei der Fertigstellung dieser Arbeit.

Ich möchte mich bei Evelyn Weiss bedanken, die mir mit ihrer Erfahrung einige Male hilfsbereit zur Seite stand. Ihre umsichtige und geduldige Art sowie ihre Tipps und Tricks haben mir das Nehmen so mancher Hürde innerhalb und außerhalb des Labors erleichtert.

Ich möchte mich bei all meinen Arbeitskollegen und Weggefährten für die schöne und aufregende Zeit im Labor bedanken, insbesondere Barbara, Ben, Chiara, Clara, Desiree, Franzi, Friederike, Ina, Lea, Luisa, Pia, Qing, Rainer, Sonja und Verena. Sie hatten immer ein offenes Ohr für Probleme jeglicher Art, haben stets Anregungen gegeben und bereitwillig ihre Süßigkeiten geteilt.

Nicht zuletzt gilt mein Dank meiner Familie, für ihre Geduld und die Unterstützung während meines Studiums, meiner Promotion sowie in allen anderen Lebenslagen. Ohne sie wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.